

QMC

Quaderni di Medicina e Chirurgia

Aminoacidi essenziali, metaboliti e vitamina D: *interplay* nella riabilitazione muscolare e metabolica

Massimo Negro¹ - Giuseppe D'Antona^{1,2}

¹ CRIAMS - Centro di Medicina dello Sport Voghera, Università di Pavia

² Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia

PACINI
EDITORE
MEDICINA

Introduzione

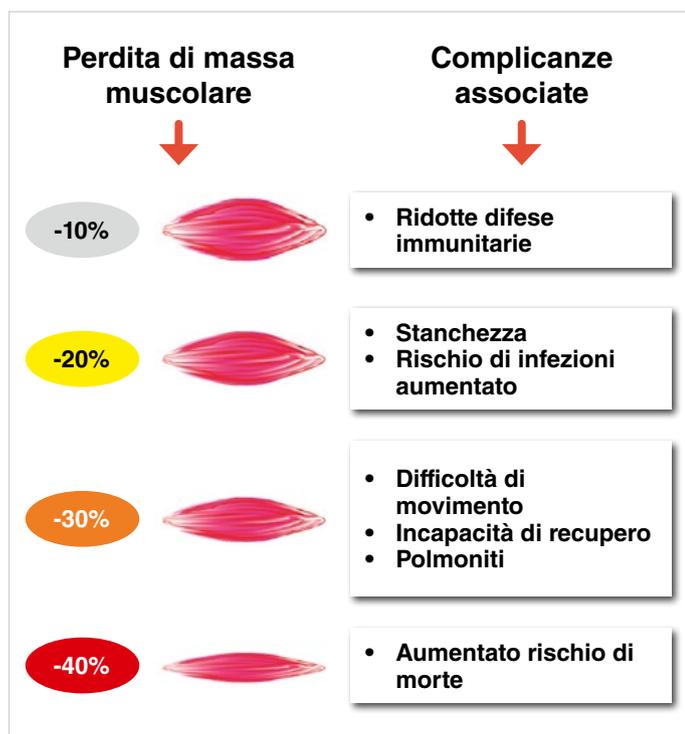
Oltre al noto ruolo strutturale e funzionale-motorio, il muscolo scheletrico rappresenta un "organo" omeostatico fondamentale per il controllo metabolico dell'intero organismo. La massa muscolare scheletrica, che costituisce circa il 45% del peso corporeo in età adulta e circa il 25% in età pediatrica, regola, infatti, il bilancio aminoacidico di organi e tessuti, nonché la disponibilità di nutrienti e precursori metabolici, fungendone da principale *reservoir*. Il muscolo scheletrico coopera, inoltre, al mantenimento del bilancio energetico generale, attraverso complessi meccanismi di *interplay* e concorre al mantenimento dello stato di salute e della qualità di vita dell'individuo. Abbondanti evidenze sottolineano, poi, la centralità di una modificazione peggiorativa del metabolismo e della funzione muscolare nella fisiopatologia di numerose condizioni, molte delle quali croniche e correlate con il fisiologico processo di invecchiamento. Nonostante queste premesse, la rilevanza clinica riferita al muscolo, alla conservazione della sua massa e forza contrattile, alla preservazione della sua funzione metabolica, oltre che endocrino-immunologica e regolatoria, non sempre viene adeguatamente considerata anche dagli addetti ai lavori. Questa mancanza di attenzione porta, inevitabilmente, a indirizzare i protocolli di cura soprattutto verso il controllo delle manifestazioni cliniche primarie legate alla malattia, senza di fatto considerare che la concomitante disfunzione muscolare può dare un rinforzo negativo sul decorso della patologia di base, aggravando ulteriormente le condizioni generali dell'individuo.

Un ruolo fondamentale nella regolazione omeostatica legata al mantenimento della massa muscolare, della sua funzionalità contrattile ed endocrino-immunologica è da attribuire alla nutrizione. Diverse evidenze sperimentali sottolineano da tempo come, tra i nutrienti, gli aminoacidi essenziali (*Essential Amino Acids*, EAA), occupino un posto centrale, non soltanto legato alla nota funzione strutturale proteica, ma anche a quella di controllo nei confronti di numerose e complesse vie biosintetiche sottocellulari, fondamentali per il mantenimento del bilancio energetico cellulare e, in ultima analisi, della stessa sopravvivenza. L'azione degli EAA sul muscolo, oltre a essere di tipo diretto, su specifici fattori di regolazione, è mediata anche dal controllo ormonale, coinvolto nei processi anabolici e catabolici, attraverso la regolazione delle sequenze trascrizionali. Da questo punto di vista, oltre al ruolo degli ormoni anabolizzanti steroidei, è intrigante ed emergente un possibile *interplay* tra vitamina D e EAA a livello muscolare, condizione che confermerebbe l'azione pleiotropica della vitamina D, consolidando l'idea di quanto sia fondamentale il mantenimento dell'integrità osteo-muscolare nel determinismo dello stato di benessere dell'uomo. Di grande interesse e attualità sono, inoltre, i dati relativi all'impiego di molecole biologicamente attive, come l'idrossi-metil-butirrato (HMB), che associate a vitamina D e EAA potrebbero svolgere importanti azioni di rinforzo sullo stimolo anabolico/metabolico complessivo, andando a sollecitare precise vie subcellulari di segnalazione.

In questa monografia discuteremo delle complesse interazioni che intercorrono tra muscolo, organismo e nutrienti, a partire dalle funzioni di controllo cellulari e molecolari, fino alla descrizione di come EAA, vitamina D e HMB possano essere impiegati nel supporto riabilitativo di soggetti affetti da patologie metaboliche. Lo scopo è quello di riequilibrare processi, come lo stress ossidativo, l'infiammazione sistemica e il catabolismo tissutale, così come l'alterazione della funzionalità mitocondriale e l'immuno-disregolazione, fondamentali per il ripristino dell'omeostasi metabolico-endocrino-immunologica legata al muscolo, alla base del percorso di guarigione.

Muscolo, metabolismo e nutrizione: la supplementazione con EAA, vitamina D e HMB in clinica

Sin dagli inizi degli anni '60 è noto che, in assenza di un'adeguata assunzione di nutrienti, il profilo aminoacidico plasmatico è assicurato a scapito delle proteine muscolari, le quali fungono da serbatoio principale ¹. Di conseguenza, per il mantenimento della struttura e funzione di tessuti e organi, così come dell'omeostasi glucidica plasmatica, la massa muscolare risulta essere un fattore critico. È intuibile quindi che in condizioni fisiologiche, in presenza di una dieta equilibrata ed eventualmente integrata, dove l'apporto di nutrienti compensa qualitativamente e quantitativamente le perdite, il mantenimento della massa muscolare, garantito dall'apporto proteico che bilancia la perdita aminocidica del periodo post-assorbitivo, permette la conservazione dell'omeostasi proteica corporea. Diversamente, in presenza di un cronico sbilanciamento nutrizionale quali-quantitativo, le perdite di massa muscolare possono diventare significative, passando dall'ipotrofia alla sarcopenia, fino ad arrivare alla più grave espressione clinica di quest'ultima (la fragilità), ripercuotendosi sullo stato generale di salute (Fig. 1) ². La fragilità associata alla sarcopenia ha dimostrato di predire il rischio di morte, disabilità e altri esiti avversi, tra cui l'atrofia della massa muscolare e il deterioramento metabolico, oltre a peggiorare le prognosi di guarigione post-chirurgica e a ritardare i recuperi dalla malattia ². La fragilità e la conseguente debolezza portano a un maggior rischio di cadute e fratture ², di ricoveri istituzionali ², riducendo drammaticamente la qualità di vita ². Fragilità e sarcopenia hanno effetti drammatici sugli equilibri dell'organismo, poiché il muscolo, oltre a fare da *reservoir* aminoacido, è sede di produzione e rilascio di un'enorme quantità di miocchine ad azione endocrina, fondamentali nel *cross-talk* che si stabilisce tra i diversi tessuti durante le risposte a infezioni, traumi e malattie ². Inoltre, l'aumento dell'infiammazione sistemica che normalmente accompagna i quadri di fragilità, specie nei soggetti più anziani affetti da malattie croniche, aggrava ulteriormente la perdita di massa muscolare, provocando anche interruzioni del controllo metabolico e neuroendocrino dell'appetito ¹. La relazione fragilità-disabilità-mortalità trova il suo fondamento

**Figura 1.**

Perdita progressiva della massa muscolare e complicanze associate.

nel rapporto “trofismo muscolare/sopravvivenza dell’individuo”, la cui espressione meccanicistica è nella nota correlazione “longevità/consumo energetico tissutale”. A questa, infatti, contribuisce primariamente il muscolo scheletrico la cui perdita, età-correlata e/o dovuta a concomitante immobilizzazione/disuso, porta allo sviluppo precoce di patologie invariabilmente associate alla mortalità.

Sulla base di quanto esposto, mantenere e/o ripristinare la massa muscolare durante un decorso di malattia è un elemento cruciale per la sua positiva evoluzione clinica. Questo è possibile attraverso l’adozione di un programma nutrizionale ottimale, che può essere supportato dall’utilizzo ragionato di supplementi dietetici e, a meno di controindicazioni (perlopiù legate alle fasi acute di malattia), da un programma di esercizio fisico controllato, notoriamente capace di produrre miglioramenti quali-quantitativi del muscolo scheletrico e di stimolare le risposte metaboliche generali dell’organismo. Dal punto di vista nutrizionale, le strategie significativamente più efficaci vedono l’adeguato apporto di proteine e aminoacidi, e tra questi soprattutto di EAA, insieme alla supplementazione di sostanze specifiche, vitamina D in particolare, e metaboliti bioattivi, come l’HMB. La letteratura sugli effetti di queste molecole offre spunti d’impiego per il paziente affetto da malattie cronico-metaboliche, sia nel corso del processo riabilitativo finalizzato al recupero funzionale (oggetto di questa trattazione), sia come supporto per la prevenzione e/o il trattamento di problematiche acute (per cause traumatiche o infettive) che, specie se associate a fasi di malnutrizione e

su soggetti anziani, possono sovrapporsi alle patologie degenerative, aggravandone il decorso.

Aminoacidi essenziali

Metabolismo

L’uomo è in grado di sintetizzare soltanto dodici dei venti aminoacidi (AA), i quali vengono resi disponibili per le esigenze biosintetiche a partire da composti precursori. I restanti otto AA (leucina, isoleucina, valina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e triptofano) devono essere assunti con la dieta e per questo definiti essenziali (EAA).

Gli AA possono essere degradati in composti carboniosi, producendo H_2O e CO_2 , e utilizzati per la gluconeogenesi. La degradazione ossidativa degli AA produce il 10-15% dell’energia totale nei mammiferi con formazione di sette intermedi metabolici. Sulla base del destino di questi intermedi, gli AA possono essere ulteriormente suddivisi in gluconeogenici, catabolizzati in piruvato, α -chetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, ossalacetato, precursori del glucosio e in chetogenici, catabolizzati in acetil-CoA e acetoacetato, precursori di acidi grassi e corpi chetonici. Tra gli EAA, leucina, isoleucina e valina sono a catena ramificata (*Branched-Chain Amino Acids*, BCAA). Una delle peculiarità dei BCAA risiede nel fatto che non essendo metabolizzati a livello epatico sono utilizzati principalmente dal tessuto muscolare scheletrico e adiposo. L’aumento della disponibilità di BCAA nelle cellule muscolari scheletriche, conseguente a *breakdown* proteico (per esercizio e/o digiuno), stimola la loro transaminazione a livello mitocondriale, grazie all’enzima BC-amino-transferasi (BCAT), con formazione di α -ketoacidi (BCKAs) che entreranno poi nel ciclo di Krebs sotto forma di isobutiril-CoA, metilbutiril-CoA e isovaleril-CoA.

EAA e funzione muscolare

Il mantenimento o le variazioni di massa di un tessuto, come quello muscolare, è il risultato di un delicato e complesso equilibrio tra sintesi (*Muscle Protein Synthesis*, MPS) e catabolismo proteico cellulare (*Muscle Protein Catabolism*, MPC), che vede il coinvolgimento di numerose vie subcellulari di segnale strettamente interconnesse tra loro e che rendono possibile una condizione di reciproco controllo, interazione e condizionamento³. Per comprendere queste interazioni, il focus deve orientarsi *in primis* sui processi di traslazione e di elongazione degli RNA, rigorosamente regolati in condizioni fisiologiche e alla base dei meccanismi di sintesi. Un ruolo fondamentale su questi processi è fisiologicamente svolto dalla chinasi target per la rapamicina nel mammifero (*mammalian Target Of Rapamycin*, mTOR), nota per formare due diversi complessi, mTORC1 e mTORC2, in base alla proteina di legame. mTOR legata a raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) forma mTORC1, inibito dalla rapamicina, mentre mTORC2 ha un ruolo solo parzialmente chiarito e non direttamente riferibile alle sintesi. Quattro input principali regolano mTORC1, cooperando o antagonizzandosi a vicenda

(nutrienti, in particolare AA e glucosio; fattori di crescita, ad esempio insulina, IGF-1; stato energetico, bilancio cellulare AMP/ATP; stress, ad esempio il carico meccanico), attraverso vie di segnale che comprendono PI3K/Akt, Ras/MAPK e AMPK. mTORC1 ha anche un ruolo centrale nel controllo glicemico, attraverso meccanismi insulino-dipendenti e indipendenti, con un importante *interplay* tra funzione aminoacidica e insulinica⁴. Gli EAA inducono aumento delle sintesi proteiche nel muscolo attraverso un processo energeticamente costoso, accompagnato da un maggiore assorbimento di glucosio e da un aumento dei relativi recettori (GLUT4). A questo si associa un aumento della funzione insulinica, la cui azione viene rinforzata dalla leucina, in grado di agire sul recettore insulinico (IR). Infatti, l'esposizione cellulare a leucina induce fosforilazione di IR e del target a valle (IRS1), il quale attiva la via di segnale PI3K/Akt (sulla quale agisce anche l'insulina), stimolando l'*uptake* di glucosio, come dimostrato *in vitro* e *in vivo*. L'*uptake* di glucosio per stimolazione da leucina sembra essere una via importante ed è stato dimostrato, almeno nel piccolo animale, come questa si mantenga anche in seguito a blocco del segnale PI3K, suggerendo l'esistenza di meccanismi insulino-indipendenti (protein kinase C, PKC). Anche isoleucina e valina possono stimolare l'*uptake* di glucosio, osservato almeno in modelli cellulari *in vitro*.

Sebbene la pleora di dati presenti in letteratura indichi come l'interazione tra EAA e insulina sulle vie di segnale possa avere un effetto metabolico benefico, non si esclude che la disregolazione della funzione catabolica dei BCAA, fortemente condizionata da vari fattori (dieta, ormoni, livello di esercizio, ecc.), possa associarsi a una evoluzione sfavorevole di questa interazione. Infatti, un difetto del catabolismo di questi AA, attraverso una ridotta espressione degli enzimi catabolici come nel caso dell'obesità, si correla a resistenza insulinica. Il quadro che sembra emergere trova un focus importante nella disregolazione di vie di segnale che coinvolgono PGC1- α e PPAR, le quali controllano l'espressione degli enzimi catabolici dei BCAA, la disponibilità intracellulare di AA, il metabolismo ossidativo (attraverso la mitocondriogenesi)⁵, la disponibilità di glucosio e la sensibilità all'insulina. È noto, infatti, come un eccesso di esposizione cellulare ai lipidi, attraverso la depressione della funzione di PGC1- α e PPAR, conduca all'accumulo di BCAA in circolo e a livello intracellulare, rappresentando la spia di un processo perturbativo assai importante dello stato energetico cellulare piuttosto che di un'azione diretta di un eccesso di BCAA sulla sensibilità insulinica. Tale affermazione è dimostrata dal fatto che le supplementazioni di BCAA nello sportivo, ovvero in presenza di un'aumentata espressione e funzione di PGC1- α , non siano mai state associate a insulino-resistenza. Nonostante la leucina venga descritta come il più efficace dei tre BCAA nello stimolare MPS, anche isoleucina e valina svolgono un ruolo importante. Non appena, infatti, la presenza degli altri due BCAA è scarsa, indipendentemente dalla quantità di leucina disponibile nel muscolo, la crescita muscolare viene inibita. Inoltre, essendo la presenza di tutti

gli EAA necessaria ai fini della sintesi proteica, una supplementazione esclusiva con dosi elevate di BCAA genererebbe meccanismi di trasporto competitivo con altri AA, riducendo di fatto la disponibilità intramuscolare⁶. Per tale motivo un supplemento che garantisca la presenza di tutti gli EAA rappresenta il fondamento razionale da impiegare in diverse patologie metaboliche e/o nella sarcopenia da *aging*, sia allo scopo di tamponare gli effetti di sbilanciamento delle sintesi e di aumento del catabolismo proteico muscolare, sia per sopperire a deficit di trasporto intracellulare.

EAA e mTOR: ruolo molecolare nella regolazione della sintesi proteica muscolare

mTORC1 promuove MPS attraverso l'azione su effettori a valle. Uno di questi è *eIF4E binding protein-1* (4E-BP1), considerato un regolatore chiave della proliferazione cellulare, che disinibisce *eukaryotic factors complex eIF4F*, il quale media fisiologicamente l'inizio della traslazione. Quando 4E-BP1 è attivo blocca il legame di eIF4E a eIF4G, precludendo di fatto il legame dell'mRNA al ribosoma. La fosforilazione di 4E-BP1 da parte di mTORC1 lo dissocia da eIF4E che può quindi sviluppare il complesso con eIF4F, consentendo l'interazione con la subunità ribosomiale 43S che a sua volta lega diversi mRNA. mTORC1 è inoltre responsabile dell'attivazione di una seconda chinasi a valle, ovvero p70S6K1. In seguito a fosforilazione da parte di mTORC1, p70S6K1 aumenta la traslazione e l'elongazione di nuovi mRNA, regola la sintesi delle subunità S6 e 40S del ribosoma e attiva i cofattori eIF4B e eIF4A. Una volta attivati eIF4B e S6 possono associarsi al complesso di inizio della traslazione promuovendo quindi questo processo. Numerosi sono quindi i meccanismi molecolari innescati dall'attivazione di mTORC1 (rimandiamo a D'Antona et al.³ per ulteriori approfondimenti) che definiscono il suo ruolo centrale e fondamentale nel regolare la traslazione e la biogenesi ribosomiale, passaggi chiave per la sintesi delle proteine.

Consolidate evidenze dimostrano come gli EAA siano regolatori essenziali della sintesi proteica muscolare (ivi compresa quella mitocondriale), agendo in maniera indiretta sulla traslocazione di mTORC1 dal lisosoma al citoplasma, con possibile successiva attivazione. Questi effetti si sviluppano in maniera indipendente dai cambiamenti della concentrazione di ormoni anabolizzanti, sebbene l'insulina sembri possedere un ruolo di facilitazione. Attualmente si ritiene che nel periodo postprandiale l'aumento significativo dell'efficienza traslazionale sia da attribuire almeno in parte ai BCAA, attraverso l'attivazione di mTORC1, mentre questi AA non sono necessari per attivare il complesso mTORC2. In particolare, la presenza di leucina aumenta notevolmente la sintesi proteica in concomitanza con l'iperattivazione della p70S6K1 e di 4E-BP1. Il trattamento con rapamicina inibisce la sintesi proteica, indipendentemente dalla somministrazione di leucina, abolendo completamente l'attivazione delle chinasi. Tuttavia, la rapamicina non è in grado di bloccare completamente la segnalazione di mTORC1

attivata dai BCAA, suggerendo come l'anabolismo dipendente dai BCAA possa interagire con altre vie di segnalazione, potenziandone l'efficacia. Tali vie potrebbero includere l'azione inibitoria dei EAA, soprattutto della leucina, ma probabilmente anche di isoleucina, valina e metionina, sulle vie inibitorie che regolano l'azione del complesso GATOR2, il quale inibisce GATOR1, permettendo così di mantenere attivo il reclutamento lisosomiale di mTORC1⁷.

Dosaggi e sicurezza

Non sono molti gli studi che hanno valutato nell'uomo gli effetti della supplementazione con BCAA o EAA al di sopra dell'*Estimated Average Requirement* (EAR). Nessun effetto avverso è stato, tuttavia, riportato da lavori nei quali dosi sovralfisiologiche di BCAA sono state somministrate a soggetti sani (da 9,75 g/die a 14,4 g/die). Anche studi su pazienti affetti da encefalopatia epatica e trattati con BCAA alla dose di 240 mg/kg/die per sei mesi non hanno fatto rilevare effetti avversi. Sulla base dei dati disponibili si ritiene che la supplementazione di BCAA sia tra le meglio tollerate, con un elevato livello di sicurezza per dosi fino a oltre 3 volte l'EAR. Il più importante fattore dietetico che può impattare sulla tolleranza ai BCAA sembra essere il contenuto di proteine nella dieta. Da questo punto di vista, i pazienti dismetabolici cronici che utilizzano proteine e/o integratori di EAA a lungo termine (> 3 mesi) potrebbero richiedere una valutazione della funzione renale. Su tale aspetto, da sempre, la letteratura offre dati controversi e i clinici sono spesso restii a consigliare questi integratori a pazienti con rischio di danno renale. I dati disponibili indicano, tuttavia, che almeno fino a 3 mesi continuativi di supplementazione con EAA (8 g/die) non ci sono effetti negativi sulla funzione renale⁸ e, inoltre, come è noto da tempo, l'utilizzo di EAA, e soprattutto BCAA, viene impiegato per la correzione del profilo aminoacidico plasmatico in pazienti in dialisi, con effetti positivi sulla proteinuria e sul ritardo della progressione della malattia renale⁹.

Ruolo degli EAA nel trattamento delle patologie croniche

EAA, invecchiamento e sarcopenia

Mantenere la massa muscolare, che significa capacità di sviluppo di forza e potenza, risulta essenziale per la sopravvivenza dell'individuo e il processo di invecchiamento fisiologico è associato al suo inevitabile declino (sarcopenia). La perdita di potenza si collega alle variazioni fenotipiche del muscolo, in quanto le fibre di tipo II sono più vulnerabili al processo sarcopenico rispetto alle fibre di tipo I e, considerando i sottotipi fibrili tipo II, si riscontra una maggiore atrofia delle fibre di tipo IIX rispetto alle fibre di tipo IIA, sia negli uomini (22% vs 13%), sia nelle donne (30% vs 24%). Anche il numero assoluto e relativo di cellule satellite diminuisce con l'invecchiamento, riducendo quindi la capacità

di rigenerazione muscolare. A partire dai 50 anni, il tasso di decadimento della massa muscolare è dell'ordine dell'1-2% all'anno, cosicché l'area della sezione trasversale del muscolo scheletrico si riduce del 25-30% all'età di 70 anni; la forza muscolare diminuisce di circa l'1,5% all'anno tra i 50 e i 60 anni e successivamente del 3% all'anno. In media, in assenza di malattia o lesione neurologica, si stima che il 5-13% degli anziani di età compresa tra 60 e 70 anni sia affetto da sarcopenia e il numero salga fino al 50% per quelli di età pari o superiore a 80 anni.

Le origini della sarcopenia sono multifattoriali e includono, principalmente, l'inattività (per riduzione della mobilità spontanea quotidiana), alcune disregolazioni endocrine (soprattutto a carico di insulina, testosterone e IGF-1), l'aumento dell'infiammazione (per maggiore produzione età-correlata di citochine pro-infiammatorie, ad esempio TNF- α e IL-1) e le carenze nutrizionali (in particolare proteine, EAA/BCAA e vitamina D). Tutte queste cause modificano il metabolismo proteico muscolare scheletrico, portando a una progressiva predominanza delle vie di segnale che controllano MPC, con attenuazione dei processi di MPS, inducendo ipotrofia muscolare fino alla concomitante perdita di forza (Fig. 2). In tal senso, studi hanno riportato come MPS nei soggetti anziani sia ridotta di circa il 30% rispetto ai giovani e MPC, soprattutto in assenza di attività fisica, sia notevolmente aumentato. La riduzione di MPS è collegata a fenomeni di "resistenza anabolica" nell'ambito delle vie segnale che la controllano. Tra questi, la resistenza al segnale insulinico sembra essere quella che impatta più negativamente sulla responsività anabolica della cellula muscolare, con inibizione della via di segnale PI3K/Akt/mTORC1. Sulle vie di amplificazione di MPC (che vede il sistema ubiquitina/proteosoma quale meccanismo centrale) agisce in particolar modo l'aumento età-correlato dell'infiammazione (*inflammaging*) attraverso l'azione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-1), le quali agiscono anche sottoregolando le vie anaboliche regolate da mTORC1 (attraverso l'attivazione del sistema trascrizionale FoxO), con conseguente potenziata depressione di MPS.

Da un punto di vista clinico, l'efficacia delle supplementazioni a base di EAA nel promuovere o recuperare il trofismo muscolare risulta particolarmente importante sia nel soggetto anziano con sarcopenia franca e a rischio di sviluppare un correlato quadro di fragilità, sia quando si è di fronte a pazienti anziani, malnutriti e già dismetabolici, per i quali la perdita significativa di massa muscolare può condizionare pesantemente la prognosi. Da questo punto di vista l'apporto di leucina all'interno di un mix di EAA è ritenuto fondamentale per bilanciare la ridotta responsività aminoacidica età-correlata delle vie mTORC1-mediate a causa di una ridotta efficienza dei trasportatori, sia intestinali, sia muscolari, che ne riducono la biodisponibilità. La leucina in virtù del suo ruolo secretagogo nei confronti dell'insulina è fondamentale per aumentare la disponibilità di AA al muscolo, inibire MPC e, in combinazione con l'esercizio fisico di forza, incrementare la produzione di testosterone e diminuire quella

di cortisolo. In linea generale l'*interplay* tra EAA e insulina migliora notevolmente quando le supplementazioni sono associate all'esercizio fisico, fondamentale nei programmi di recupero metabolico muscolare. Sia l'immobilizzazione, sia la ridotta attività motoria sono state associate alla comparsa d'insulino-resistenza muscolare in breve tempo (3-14 giorni), la quale sembra essere predittiva nei confronti dello sviluppo di atrofia muscolare ¹⁰.

La maggior parte dei lavori in letteratura indica una dose di EAA di riferimento pari a circa 10 g/die (contenente circa 2,5 g di leucina) per stimolare la sintesi proteica muscolare nell'anziano. Un recente studio condotto presso il nostro laboratorio ha dimostrato come una supplementazione della durata di 3 mesi con EAA (10 g/die; leucina 2,8 g/die), addizionati a vitamina D, su soggetti anziani attivi, ma non sottoposti a programmi di rinforzo muscolare, di età compresa tra 65 e 80 anni, sia capace d'incrementare la massa muscolare (appendicolare) di circa mezzo kg, rispetto al placebo, con significativi miglioramenti anche della forza massima isometrica e della potenza muscolare ¹¹.

Il supporto degli EAA alla funzione muscolare risulta, inoltre, fondamentale per compensare il disequilibrio acido-base che tipicamente tende a manifestarsi con l'età. Dai 20 agli 80 anni, infatti, la velocità di filtrazione glomerulare diminuisce del 50% e questo è spesso associato a malattia renale cronica in soggetti di età superiore a 60 anni e acidosi metabolica. Questa condizione si lega frequentemente ad accelerata e significativa perdita muscolare dovuta al fatto che MPC fornisce al fegato i substrati aminoacidici per la sintesi di glutammina, utilizzata poi dal rene per sintetizzare ammoniaca e tamponare gli idrogenioni in eccesso ¹².

EAA, obesità e diabete

Per il trattamento dell'obesità (e a maggior ragione dell'obesità sarcopenica) l'utilizzo di supplementi a base di EAA trova un forte razionale sulla base dei risultati di ricerche che utilizzano diete a elevato contenuto proteico. Importanti acquisizioni mostrano, infatti, come una diminuzione dell'assunzione di cibo, seguita da un'immediata perdita di peso corporeo ¹³, si possa ottenere aumentando il contenuto

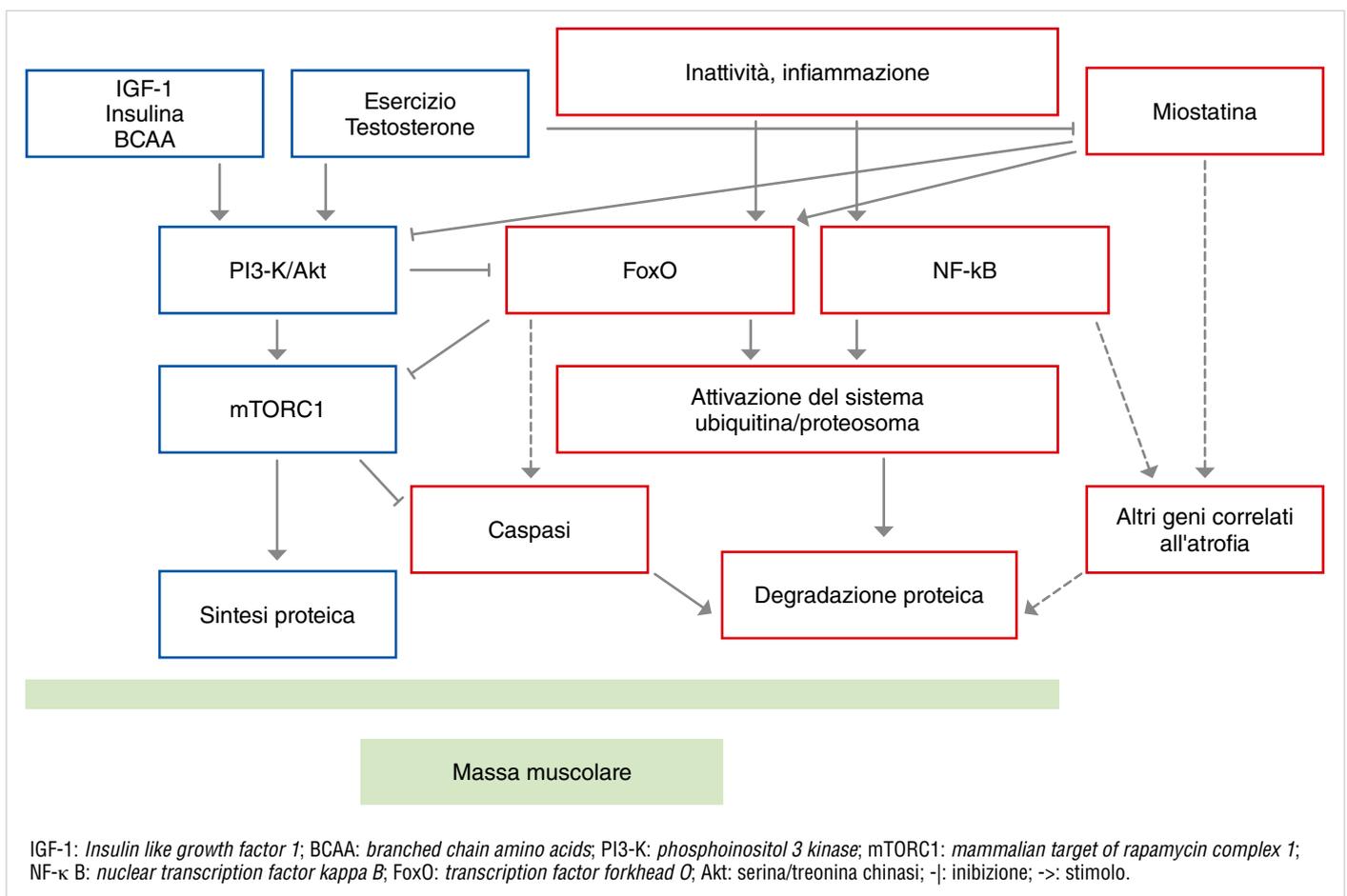


Figura 2.

Principali vie di segnale che controllano i meccanismi di sintesi (in blu) e degradazione proteica (in rosso). Le frecce tratteggiate rappresentano vie ancora ben caratterizzate.

proteico della dieta, passando cioè dal 10-15% in termini di apporto calorico a un livello più alto (20-40%). Questa capacità è stata anche descritta in ulteriori studi che dimostrano come interventi nutrizionali ad alto contenuto di proteine, sia a breve, sia a lungo termine, possano offrire vantaggi tanto sulla perdita di peso corporeo iniziale, quanto sul mantenimento del peso perso, rispetto ai regimi dimagranti convenzionali. Tali effetti sembrano essere regolati da meccanismi che includono: 1) il prolungato senso di sazietà nonostante il bilancio energetico negativo; 2) un aumento della termogenesi e del dispendio energetico basale; 3) un significativo risparmio di massa corporea magra, fattore che regola criticamente il tasso metabolico a riposo durante la riduzione del peso, molto importante in presenza di obesità sarcopenica. Studi di elevata qualità, come l'*International Study of Macro-Micronutrients and Blood Pressure* (INTERMAP), dimostrano, inoltre, che un maggiore apporto di EAA è associato a minore prevalenza di sovrappeso o obesità negli individui di mezza età di Paesi occidentali e asiatici. Questa evidenza sembra rafforzare l'ipotesi che gli EAA, e soprattutto i BCAA, a differenza degli AA non essenziali, possano esercitare effetti esclusivi sul ripristino metabolico del soggetto obeso, correlandosi con l'aumento della secrezione di leptina, la diminuzione dell'assunzione di cibo e del peso corporeo tramite segnali mTORC1-mediati, il miglioramento dell'assorbimento del glucosio muscolare e del metabolismo glucidico generale, identificando così la loro integrazione dietetica come una potenziale strategia per la prevenzione e il trattamento dell'obesità (Fig. 3). Con particolare riferimento alla stimolazione del complesso mTORC1 da parte di miscele di

EAA, anche a livello extra-muscolare, riteniamo ci possano essere risvolti meccanicistici di grande interesse in soggetti in sovrappeso. È stato, infatti, sperimentalmente dimostrato come la soppressione di mTORC1 negli adipociti possa bloccare fenomeni proliferativi in risposta al freddo a carico del tessuto adiposo bruno, riducendo la biogenesi mitocondriale e il metabolismo ossidativo⁷. Parallelamente, un incremento dell'attività di mTORC1 nel muscolo scheletrico può effettivamente promuovere la tolleranza al glucosio e lo stimolo sulle sintesi proteiche⁷. Tali considerazioni risultano di grande interesse soprattutto nei casi di obesità sarcopenica, la quale ha una prevalenza significativa nella popolazione: 12,6% negli uomini e 33,5% nelle donne in età adulta; 48% e 27,5% in femmine e maschi ultraottantenni, rispettivamente¹⁴. Inoltre, sempre attraverso l'attivazione di mTORC1 e in parte attraverso la soppressione di AMPK a livello dei nuclei paraventricolari, la presenza di EAA (leucina in particolare), controlla l'attività di neuropeptidi ipotalamici implicati nel controllo dell'appetito, inibendo il neuropeptide Y e il peptide correlato alla proteina agouti, entrambi oressigenici, aumentando invece la pro-opiomelanocortina, a effetto anoressigeno. Il controllo della sazietà, attraverso la presenza di AA, coinvolge anche l'aumento del rilascio di altri fattori, come CCK, PYY e GLP-1, da parte dell'intestino tenue e l'inibizione di ghrelina, peptide notoriamente ad azione oressigena. Nel trattamento del diabete, un ruolo interessante delle supplementazioni di EAA consiste nell'effetto di miglioramento dell'omeostasi del glucosio attraverso un aumento del suo *uptake* cellulare e della sensibilità insulinica. Numerosi sono, infatti, gli studi che, sia nell'animale, sia nell'uomo, hanno di-

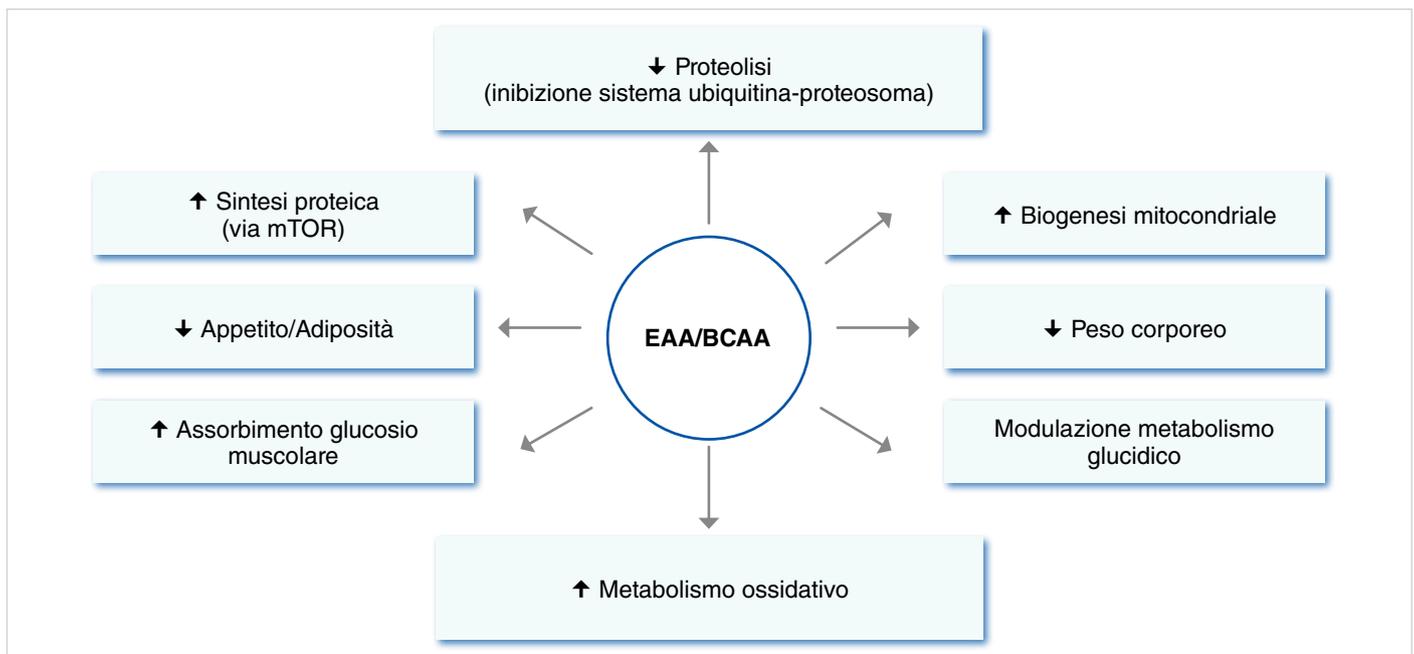


Figura 3.

Schematizzazione del ruolo dei EAA/BCAA nel controllo di meccanismi coinvolti nella prevenzione e trattamento dell'obesità.

mostrato un incremento della tolleranza glucidica somministrando singoli AA o mix contenenti EAA o BCAA. Sulla base delle acquisizioni molecolari è intuibile che questa azione si possa realizzare attraverso cinque possibili meccanismi: 1) un effetto secretagogo sulle cellule beta insulari; 2) il controllo delle sintesi; 3) la regolazione della sensibilità insulinica a livello periferico, specie mediata dall'incremento di massa magra; 4) il ruolo antiossidante; 5) l'effetto mitocondriogenico mediato da PGC1- α (ridotto del 50% nel prediabetico).

In merito all'effetto secretagogo, arginina, glutammina e leucina (e altri tra cui taurina, isoleucina, valina, treonina e istidina) svolgono un ruolo critico, con uno stimolo secretorio sinergistico che risulta potenziato in presenza di glucosio¹⁵. Al di là di meccanismi molecolari alla base della funzione secretagoga (per ulteriori approfondimenti vedi D'Antona et al.⁴), evidenze indicano come la presenza di leucina, anche a basse dosi e specie se somministrata con carboidrati, possa risultare assai significativa nella disfunzione insulare con perdita di iperinsulinemia compensatoria, come tipicamente avviene nel diabete tipo 2 (T2DM). In questi casi la supplementazione aminoacidica dimostra un miglioramento dei livelli glicemici e di emoglobina glicata¹⁶.

Nonostante molti dati sostengano l'utilizzo di EAA per il miglioramento della sensibilità insulinica nel diabetico¹⁶, altri suggeriscono che l'esposizione eccessiva a BCAA e un aumento dei livelli di BCAA circolanti possano essere predittivi di T2DM, sebbene non sia chiaro se la perdita della funzione insulinica rappresenti una conseguenza o la causa. Quello che sembra chiaro, invece, è la comparsa di alterazione del catabolismo dei BCAA, come si realizza in modelli animali, sia di diabete, sia di obesità, e questo sembra correlarsi alla liberazione di adipochine dal tessuto adiposo (come adiponectina, resistina e visfatina), la quale si associa a insulino-resistenza¹⁷. Tutte queste osservazioni suggeriscono la necessità di ulteriori studi futuri orientati alla valutazione delle differenze di effetto in seguito a esposizione di EAA, associati al miglioramento del quadro glicemico in soggetti anziani e in presenza di disfunzione epatica cronica, rispetto ai soli BCAA, associati ad aumentato rischio di T2DM^{16,18}.

EAA e malattie cardiovascolari

La disponibilità plasmatica di AA è cruciale per il normale funzionamento del cuore. Il tessuto miocardico utilizza AA per le sintesi, regolate, oltre che dalla loro disponibilità, anche dalla presenza di ossigeno e di ormoni anabolici. Gli AA aumentano, inoltre, il consumo energetico così come l'ossidazione del glucosio nei cardiomiociti, stimolando la bioenergetica mitocondriale¹⁹. Tali effetti sembrano maggiormente ascrivibili ai BCAA, importanti sia come substrati energetici locali, essendo la loro transaminazione a livello miocardico tre volte superiore a quella che si riscontra nel tessuto muscolare scheletrico, sia come effettori anabolici primari, coinvolgendo l'azione di mTORC1 nella regolazione di MPS a livello cardiaco.

Benché alcuni aspetti rimangano per certi versi ancora enigmatici, in generale le malattie cardiovascolari si asso-

ciano a un difetto del metabolismo cardiaco degli AA, soprattutto BCAA, con ripercussioni sui loro livelli circolanti. Nei pazienti con scompenso cardiaco cronico (SCC) è stata, infatti, osservata una ridotta concentrazione plasmatica di EAA e BCAA, fattore che è stato correlato alla gravità della malattia. Questo riscontro clinico sembra essere frutto di un ipercatabolismo aminoacidico nel tessuto miocardico, implicato nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca, ed è associato a elevati livelli di stress ossidativo con profondi cambiamenti metabolici a carico del cuore. In pazienti con SCC, un lavoro di Aquilani et al.²⁰ ha messo in luce come l'adozione di una dieta isocalorica e ricca di proteine (1,3 g/kg/die) di fatto non sia sufficiente a ripristinare il normale livello plasmatico di EAA e di BCAA in questi soggetti, e come l'ingestione giornaliera di proteine debba essere integrata con supplementi a base di EAA. Nonostante questo, l'effetto dell'assunzione di proteine e AA sulla progressione dello SCC deve ancora essere completamente chiarito, in quanto sulla materia esistono dati contrastanti in letteratura. Se nell'animale con SCC un elevato apporto proteico con la dieta non influisce negativamente sulla massa cardiaca, i volumi del ventricolo sinistro, la frazione di eiezione o la capacità ossidativa mitocondriale del miocardio, nell'uomo studi indicano come livelli sierici elevati di BCAA, in particolare di valina e leucina, possano di fatto rappresentare un marker di rischio cardiometabolico, indipendentemente dal BMI del soggetto. Tuttavia, va sottolineato come molte indagini epidemiologiche abbiano coinvolto soggetti diabetici, nei quali gli elevati livelli plasmatici di AA si associano a iperinsulinemia (con alterazione dell'*interplay* AA-insulina) e ipoadiponectinemia, fortemente correlati con l'aumento del rischio cardiovascolare²¹. Alla luce di questi dati riteniamo, pertanto, che nei pazienti cardiopatici cronici, in recupero metabolico, i profili aminoacidici plasmatici e insulinemici debbano essere monitorati nei normali controlli di routine e una supplementazione di EAA non si debba escludere *a priori*. Frequentemente questi soggetti hanno una scarsa *compliance* dietetica e un corretto apporto di EAA risulta quindi fondamentale anche per supportare adeguatamente la massa muscolare, che molto spesso non presenta un normale trofismo. Lo SCC causa, infatti, profondi cambiamenti disfunzionali nel muscolo scheletrico, aggravando il quadro della disabilità fisica. Questi cambiamenti includono: una diminuzione del numero di fibre muscolari di tipo I e della loro capacità ossidativa, una riduzione dell'area della sezione trasversale delle fibre muscolari di tipo II, un calo del volume mitocondriale all'interno delle fibre muscolari, a cui si associa una marcata riduzione degli enzimi necessari per il metabolismo aerobico e un aumento degli enzimi glicolitici. I pazienti con SCC hanno anche maggiori probabilità di sviluppare atrofia muscolare, con significative perdite di forza. Benché i dati sull'utilizzo di EAA in pazienti con SCC siano ancora limitati a pochi studi, una recente revisione sistematica indica come 2-6 mesi di trattamento con dosaggi giornalieri di circa 8 g, in una o due somministrazioni, possano incrementare la massa magra e ridurre

l'insulino-resistenza, con un miglioramento significativo della funzione muscolare di tipo aerobico⁸.

EAA e immunologia

L'utilizzo di EAA viene discusso in diversi contesti clinici che coinvolgono il sistema immunitario, in quanto sostanze fondamentali sia per sostenere il metabolismo energetico e la sintesi di proteine nelle cellule immuno-competenti, sia per ridurre MPC e promuovere MPS a livello muscolare (come descritto nei paragrafi precedenti), con ripercussioni positive sull'intero assetto immunologico. Fondamentale il ruolo dei BCAA che, essendo donatori di azoto e di scheletri carboniosi, sono precursori (leucina in particolare) per la sintesi di glutammina, importante substrato trofico-energetico per le cellule immunitarie.

Lavori interessanti sull'utilizzo degli EAA provengono da contesti residenziali con soggetti anziani ricoverati e a significativo rischio di sviluppare infezioni (segnalate in oltre l'80% dei casi) per varie cause: ridotta immunocompetenza legata al contesto di provenienza (reparti medici e chirurgici acuti), risposta infiammatoria post-acuta, trasfusioni perioperatorie, lungodegenza e malnutrizione. Su questi pazienti la somministrazione di 8 g/die (4 g mattino + 4 g pomeriggio) di EAA per 30 giorni ha ridotto del 30% il tasso complessivo di tutte le infezioni registrate (da piaghe, basse vie respiratorie, urinarie, gastro-intestinali)²². Al di là di un effetto metabolico-nutrizionale generale, sui possibili meccanismi d'azione si sono fatte alcune ipotesi: 1) azione migliorativa degli EAA sulla proliferazione dei linfociti e del sistema fagocitario monocito-macrofagico; 2) aumento della sintesi di glutammina; 3) stimolo proliferativo dato dalla presenza di metionina, donatore di metili, substrato per la produzione di basi nucleotidiche.

Gli effetti immunitari dei mix contenenti EAA trova giustificazione nella presenza di BCAA²¹. Infatti, la carenza in BCAA nella dieta riduce significativamente la produzione di linfociti e aumenta in generale la suscettibilità ai patogeni. L'integrazione di BCAA in soggetti immuno-compromessi (cirrotici) ha dimostrato di ripristinare la funzione fagocitaria dei neutrofili e l'attività citotossica specifica delle cellule *Natural Killer*. Inoltre, varie evidenze indicano come i BCAA possano migliorare diversi aspetti dell'immunità innata e acquisita, potenziando la capacità di difesa dell'ospite attraverso diversi meccanismi: produzione di IgA secretorie, a protezione delle superfici mucose; sintesi di Ig intestinali; modulazione di citochine pro-infiammatorie; stimolo del sistema antigene-presentante; ripristino della capacità dei monociti circolanti di proliferare, in risposta ai mitogeni, dopo stress fisico importante (esercizio intenso su lunga distanza) associato a immunosoppressione.

Recentemente, infine, alcuni autori hanno iniziato a delineare un possibile *interplay* tra microbiota intestinale (MI) e EAA²³. Il mantenimento dell'integrità e dell'equilibrio del MI è fondamentale, sia per il suo ruolo di barriera meccanica, impedendo l'assorbimento di endotossine luminali che una volta entrate nel circolo ematico possono scatenare risposte infiammatorie

sistemiche, sia perché insieme ai grandi sistemi di regolazione (immunologico, endocrino, nervoso) controlla la produzione di ormoni, neurotrasmettitori e citochine. Evidenze sperimentali hanno ormai sottolineato come un'alterazione del MI sia strettamente correlata allo sviluppo e all'evoluzione di patologie croniche come obesità, diabete, malattie infiammatorie croniche intestinali (morbo di Chron, colite ulcerosa), malattie autoimmuni (ad es. artrite reumatoide) e aterosclerosi. Per il mantenimento del benessere del MI gli AA svolgono un ruolo primario in quanto substrati e fonti di azoto per la fermentazione microbica nel colon. Inoltre, la loro presenza a livello intestinale stimola la produzione di β -defensine mucosali, prodotte dalle cellule epiteliali e facenti parte dell'immunità innata. A questa azione locale si uniscono dati emergenti²⁴ che suggeriscono l'esistenza di un asse "muscolo-intestino" capace di mettere in relazione la funzione regolatoria del muscolo scheletrico, attraverso la produzione e liberazione di miochine, con la struttura e la composizione del MI, aprendo quindi ulteriori prospettive future circa l'utilizzo di EAA in ambito clinico.

EAA e BPCO

Tra le malattie respiratorie croniche la bronco pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) rappresenta la condizione di più frequente riscontro nella popolazione anziana. Se si considera attentamente la fisiopatologia della BPCO, l'utilizzo di supplementi a base di EAA in questi pazienti può avere importanti ripercussioni nei protocolli di trattamento e recupero funzionale. In linea del tutto generale, considerando che l'età media di insorgenza della BPCO è 64 anni, è intuibile come le modificazioni secondarie a carico della muscolatura respiratoria e periferica prodotte dalla malattia vadano a sommarsi a quelle indotte dal processo di invecchiamento *per se* e come questo abbia conseguenze sul necessario approccio di riabilitazione metabolico-nutrizionale. Inoltre, come accade frequentemente, specifici deficit nutrizionali si sommano alle modificazioni funzionali primarie del polmone, determinando un ulteriore aggravamento del processo cronico. Da questi punti di vista, tra tutte le malattie respiratorie la BPCO risulta essere la più paradigmatica. Questa condizione si caratterizza per una limitazione persistente al flusso aereo, in genere evolutiva, e si associa ad aumentata risposta infiammatoria cronica agli inquinanti respiratori. La gravità della condizione clinica è collegata a periodiche riacutizzazioni e alla presenza di comorbidità croniche, tra le quali la perdita di massa muscolare occupa un posto di primo piano. Nei pazienti con BPCO è stata, infatti, riscontrata una riduzione delle masse muscolari scheletriche, specie degli arti inferiori (quadricipite femorale), rispetto a soggetti normali di pari età. In una minoranza di pazienti questa condizione si deve all'insorgenza di un processo ipercatabolico²⁵, mentre nella maggior parte dei casi è conseguente al decondizionamento fisico, per l'importante limitazione all'esercizio, con inevitabili perdite di tessuto muscolare. A questo si sommano altri processi come l'aumento del lavoro e del consumo energetico respiratorio, dovuto all'aumento della resistenza inspiratoria/espiratoria, del diminuito ritorno

elastico toraco-polmonare e dell'iperinflazione dinamica. In queste condizioni il processo atrofizzante vede una cronica attivazione del sistema nervoso simpatico, con aumento dello stress ossidativo e incremento dell'infiammazione sistemica (elevata produzione di $\text{TNF-}\alpha$), alla quale segue un maggiore catabolismo proteico²⁶. Inoltre, l'adattamento cronico all'ipossia determina un'alterazione del fenotipo fibrile del muscolo scheletrico, con un aumento della proporzione di fibre tipo II e una riduzione della funzione cellulare mitocondriogenica²⁷ anche per via dello spiccato decondizionamento motorio²⁸. Il processo involutivo muscolare è favorito, inoltre, dall'uso prolungato di farmaci steroidei, notoriamente associati ad atrofia muscolare, e al concomitante deterioramento della condizione nutrizionale del paziente.

In diversi studi è stato riportato che le supplementazioni aminoacidiche in pazienti affetti da BPCO possono portare a un miglioramento metabolico significativo. Autori suggeriscono come una somministrazione di EAA pari a 8 g/die per tre mesi a soggetti ultrasessantenni in cachessia da BPCO possa migliorare la massa magra di circa 1,5 kg, incrementando la capacità aerobica di lavoro muscolare con una riduzione del 23% del lattato ematico²⁹.

In generale i lavori disponibili sono concordi sull'efficacia

delle supplementazioni con EAA nel migliorare la tolleranza allo sforzo di pazienti con BPCO, sia nel corso delle normali attività quotidiane, sia qualora entrino a far parte di programmi di riabilitazione metabolica.

Vitamina D

Sintesi e metabolismo

La vitamina D è un pro-ormone steroideo, liposolubile, assai conosciuto per il ruolo fisiologico di controllo dell'assorbimento intestinale di calcio e per il mantenimento dell'omeostasi di calcio e fosforo. La vitamina D è fisiologicamente presente in due forme, il colecalciferolo (vitamina D_3) e l'ergocalciferolo (vitamina D_2). L'80-90% della sintesi endogena di vitamina D si realizza nella cute in seguito a esposizione alle radiazioni UV che determinano la conversione del precursore 7-deidrocolesterolo in pre-vitamina D_3 (Fig. 4). In seguito a isomerizzazione, la pre-vitamina D_3 si trasforma in colecalciferolo, il quale legandosi alla proteina di trasporto raggiunge il fegato per essere sottoposto a un primo processo di idrossilazione, grazie all'enzima vitamina D 25-idrossilasi, con formazione di 25-idrossi vitamina D (25(OH)D).

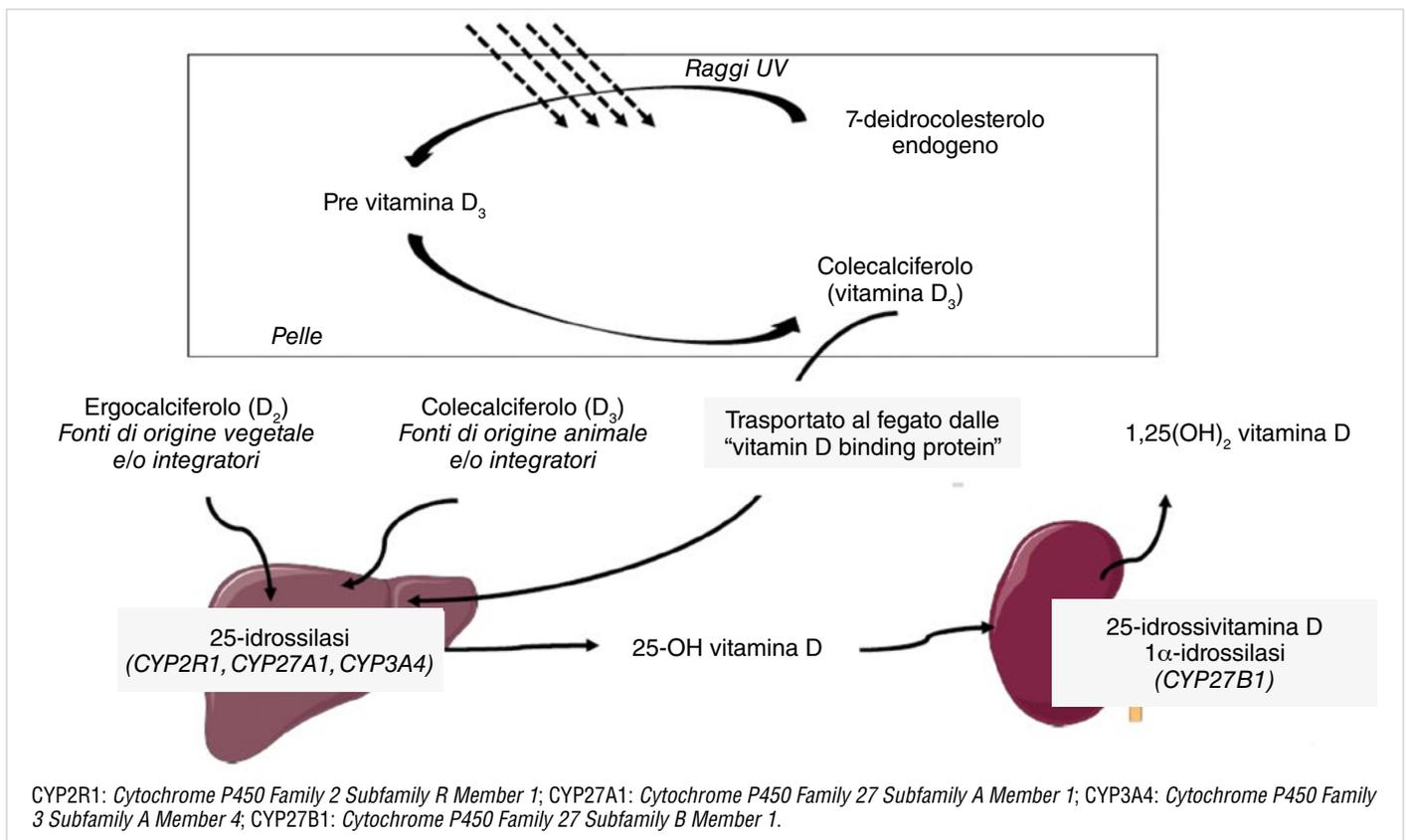


Figura 4.

Origine e destino della vitamina D di provenienza endogena ed esogena e suo metabolismo epatico (prima) e renale (dopo), con indicazione dei citocromi coinvolti.

Quest'ultima subisce un ulteriore processo di idrossilazione, questa volta a livello del tubulo renale prossimale a opera dell'enzima 1- α -idrossilasi, con formazione della forma attiva 1,25-diidrossi vitamina D (1,25(OH)₂D o calcitriolo). La presenza dell'enzima 1- α -idrossilasi è stata rilevata anche in alcune linee cellulari muscolari *in vitro* e nei miotubi primari di topo, suggerendo così la possibilità di una fine regolazione dell'espressione muscolare di vitamina D. Il catabolismo dei metaboliti della vitamina D avviene grazie al CYP27A1 ovvero una 27-idrossilasi epatica. Considerando il fatto che l'espressione tissutale di calcitriolo è strettamente regolata e solo quantità picomolari sono rilevabili in circolo, la forma monoidrossilata 25(OH)D totale viene normalmente dosata in quanto considerata affidabile indicatore dello stato vitaminico dell'individuo. Nonostante ciò, si ipotizza che alcune funzioni della vitamina D siano strettamente correlabili con la forma libera di 25(OH)D e in misura minore alla forma totale. Ad esempio, la forma libera si correla meglio ai livelli di densità minerale ossea e ai livelli di ormone paratiroideo, indicando la necessità di valutarne le concentrazioni ematiche (oltre a quelle totali) ^{30,31}.

Solo una quota minoritaria (0-20%) di vitamina D ha origine esogena (dieta) e contribuisce al pool disponibile. Questa viene assorbita a livello intestinale attraverso un processo analogo a quello dei lipidi, ovvero incorporata in micelle negli enterociti e trasportata mediante chilomicroni. La vitamina D₃ è presente in cibi di origine animale (ad es. fegato 0,8-7,7 μ g/100 g; pesci grassi 8,3 μ g/100 g; tuorlo d'uovo 12,7 μ g/100 g) o in cibi fortificati, mentre la vitamina D₂ si trova in alcuni vegetali (funghi: *Boletus edulis* 58,7 μ g/100 g, *Cantharellus cibarius* 10,7 μ g/100 g; burro di cacao 2,9 μ g/100 g) oltre che in prodotti fortificati.

Meccanismi d'azione

Una volta liberato in circolo il calcitriolo si lega alla proteina di trasporto (*vitamin D-binding protein*, DBP), che permette alla vitamina di raggiungere i tessuti bersaglio, dove il riconoscimento da parte del suo recettore (*vitamin D Receptor*, VDR) darà luogo all'innescamento di precisi *signalling* intracellulari. Il legame al recettore VDR è seguito da un cambiamento conformazionale cui segue il legame con il *retinoid X receptor-RXR* per formare un complesso, 1,25D-VDR-RXR, traslocato nel nucleo con conseguente attivazione della trascrizione mediante legame al *vitamin D response elements* (VDRE). Il legame al DNA può avvenire anche senza mediazione di VDRE, amplificando di fatto la possibile risposta. Quando VDR lega VDRE recluta complessi co-regolatori necessari per la sua attività genomica. Questi complessi possono variare in diversi tipi cellulari, consentendo alla vitamina D di avere una specifica selettività d'azione, con solo parziali sovrapposizioni, soprattutto quando si confrontano i risultati con differenti tempi di esposizione alla vitamina. 1,25(OH)₂D in alcuni contesti esercita effetti troppo rapidi per coinvolgere un'azione sul DNA cellulare. Il primo a essere identificato riguardava la rapida stimolazione del trasporto intestinale del calcio ³². La scoperta del recettore per la vitamina D ha incoraggiato

la ricerca del suo ruolo negli effetti rapidi non genomici, consentendo di identificare la loro localizzazione subcellulare (caveole di membrana), le risposte di attivazione enzimatica (chinasi e fosfatasi) e gli effetti sui canali ionici ³³.

Vitamina D e funzione muscolare

Di estremo interesse ai fini della nostra trattazione gli ormai parzialmente noti effetti della vitamina D a livello muscolare scheletrico. La gran parte delle informazioni disponibili sull'argomento si devono a studi eseguiti su cellule in coltura (specie mioblasti) e sul muscolo scheletrico di modelli murini. Diverse evidenze confermano un ruolo fondamentale di VDR nei processi di differenziamento cellulare. La presenza di VDR nel muscolo risente di una supplementazione esogena di vitamina D, come dimostrato nel muscolo scheletrico di donne anziane in condizione di ipovitaminosi ³⁴, condizione nella quale, viceversa, è possibile rilevare una perdita di VDR. Alcune evidenze suggeriscono che la ridotta espressione età-correlata del recettore possa contribuire ai processi sarcopenici, condizione rafforzata dalla variazione della composizione fenotipica verso una maggiore percentuale di fibre lente associata al processo di invecchiamento ²⁸, visto che VDR è preferenzialmente localizzato in quelle veloci. Pertanto non stupisce il fatto che la supplementazione di vitamina D possa migliorare lo sviluppo di forza nel soggetto anziano ³⁵. Il correlato tra vitamina D e sviluppo di forza trova, inoltre, fondamento nel ruolo di controllo dell'omeostasi di calcio e fosforo, rientrando quindi direttamente nella regolazione della contrazione e del tono muscolare. Infatti, la carenza di vitamina D produce un ridotto *re-uptake* di calcio dal reticolo sarcoplasmatico e un allungamento della fase di rilassamento della contrazione. Il ruolo della vitamina D è importante anche a livello mitocondriale, probabilmente mediato da VDR e PGC1- α . Un'evidenza di grande importanza riguarda, infatti, l'alterazione dell'*uptake* mitocondriale di calcio, con conseguente disfunzione nella mitocondriogenesi, derivante da un'insufficiente disponibilità di vitamina D. Come possibile conseguenza del processo di regolazione mitocondriale, la vitamina D controlla anche lo stress ossidativo ³⁶. In tal senso, i livelli sierici di vitamina D sono stati correlati a quelli di aggressione radicalica in presenza di malattie croniche come l'asma ³⁷.

Evidenze sperimentali suggeriscono che il coinvolgimento della vitamina D nel *signalling* anabolico-catabolico possa contribuire alla definizione dei suoi effetti a livello muscolare e, dal nostro punto di vista, l'intersezione della sua attività con quella degli EAA potrebbe risultare fondamentale in tal senso. A questo si aggiunge la non trascurabile funzione della vitamina D nel condizionare la disponibilità aminoacidica nell'organismo, attraverso la regolazione della funzione dei trasportatori a livello renale e intestinale.

Per quanto riguarda il catabolismo cellulare, è stato riscontrato un controllo diretto della vitamina D sul sistema ATP-ubiquitina dipendente (*ATP-dependent ubiquitin proteasome pathway*), coinvolto nella degradazione di proteine non lisosomiali. La carenza di vitamina D è stata associata ad au-

mento significativo di fattori come atrogin-1 (*MaFbx*, *muscle atrophy F-box protein*) e MuRF1 (*muscle ring finger protein*) (Fig. 5). Queste sono ligasi dell'ubiquitina E3, espresse nel muscolo scheletrico, che dirigono il processo di poliubiquitinazione delle proteine indirizzandole alla proteolisi, grazie al segnale di miostatina e TGF- β (che aumenta nel processo d'invecchiamento) (Fig. 6). Miostatina e TGF- β innescano le vie di segnale smad 2/3 e p38MAPK che agiscono da fattori di trascrizione³⁸ per atrogin-1 e MuRF1 (Fig. 6) promuovendo il catabolismo muscolare. Nonostante questo, è importante sottolineare che la vitamina D è in grado di attivare le *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2* (ERK 1/2) e la p38 MAPK, attraverso la via *steroid receptor coactivator complex* (Src), garantendo il mantenimento della massa muscolare (Fig. 5, 6). Questa apparente discrepanza si giustifica dal ruolo dicotomico di p38MAPK nella regolazione di numerose attività cellulari. Infatti, questa chinasi sembra attivarsi per stimoli catabolici, come stress ossidativo e citochine infiammatorie, ma anche per stimoli anabolici, come la stessa disponibilità di vitamina D, l'esercizio o l'insulina. Gli effetti della vitamina D sulla via di segnale p38MAPK sembrano delineare un effetto prevalentemente anabolico. Lo

stesso dicasi per l'azione su ERK1/2, coinvolte negli effetti anabolici di IGF-1 che, attraverso la via di segnale IGF1/Akt/FoxO, rappresentano il regolatore principale delle dimensioni cellulari del muscolo insieme a NFkB, miostatina e i glucocorticoidi (Fig. 6). L'IGF-1 sembra produrre un aumento della disponibilità di 1,25(OH)₂D, per effetto sull'idrossilasi-1 α , così come 1,25(OH)₂D aumenta i livelli sierici dell'ormone. Nella via IGF-1/Akt/FoxO, Akt controlla le sintesi via mTORC1 e le degradazioni attraverso fattori di trascrizione della famiglia FoxO (Fig. 5).

Oltre agli effetti anticatabolici, la vitamina D possiede anche effetti anabolici. Il primo studio *in vivo* che ha mostrato questa associazione risale al 1975³⁹ e ha messo in luce un aumento dell'incorporazione di leucina marcata nelle proteine muscolari del ratto. Al di là dei meccanismi subcellulari alla base del processo, esistono alcune importanti indicazioni di un effetto ipertrofico della vitamina, quanto meno nei mioblasti *in vitro*, mentre *in vivo* è evidente un effetto sulla forza e sulle sintesi proteiche nelle fibre veloci⁴⁰. Sulla base di quanto descritto è chiaro un coinvolgimento della vitamina D nella regolazione di numerosi processi (sintesi proteiche, funzione mitocondriale, mitocondriogenesi e

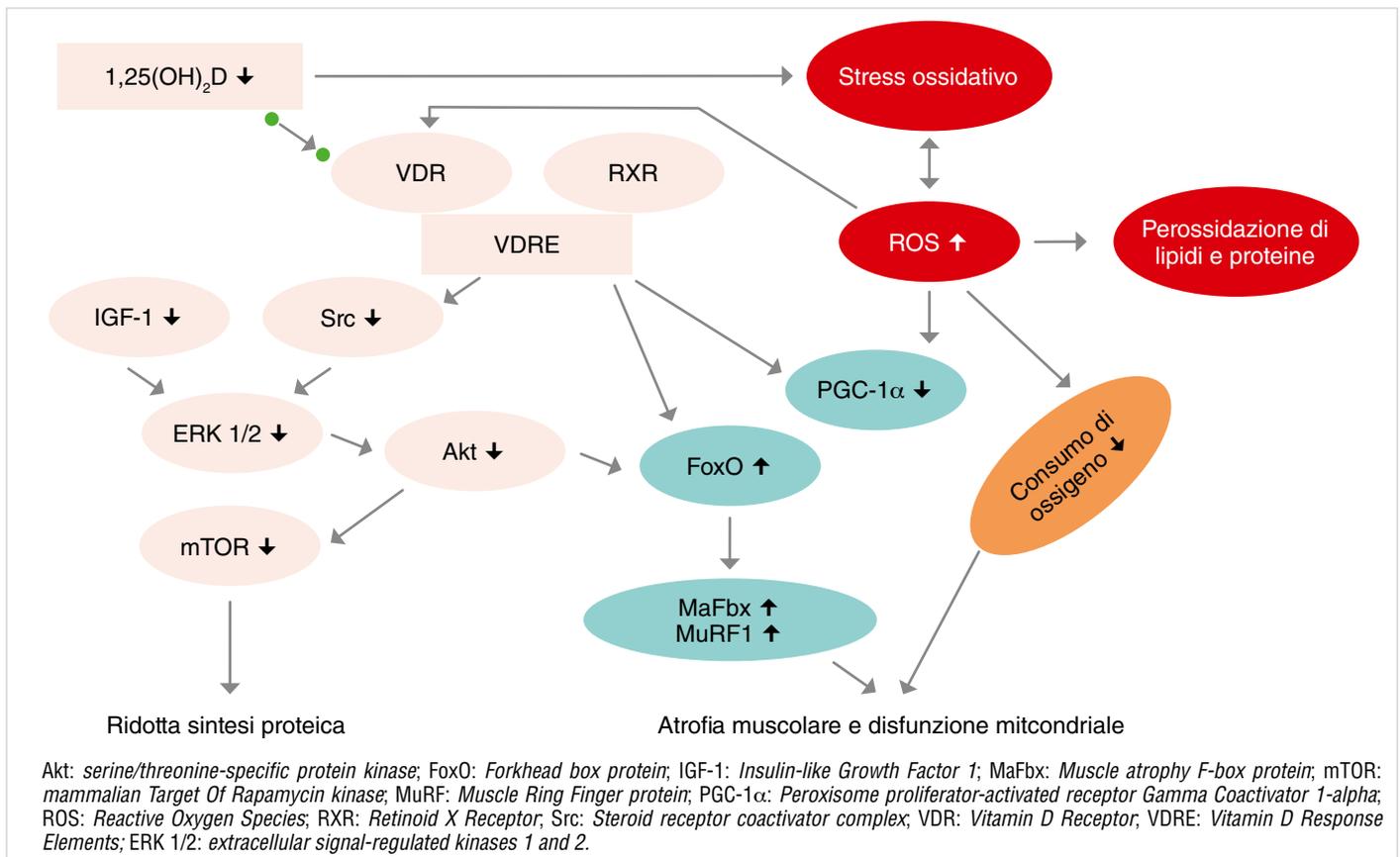
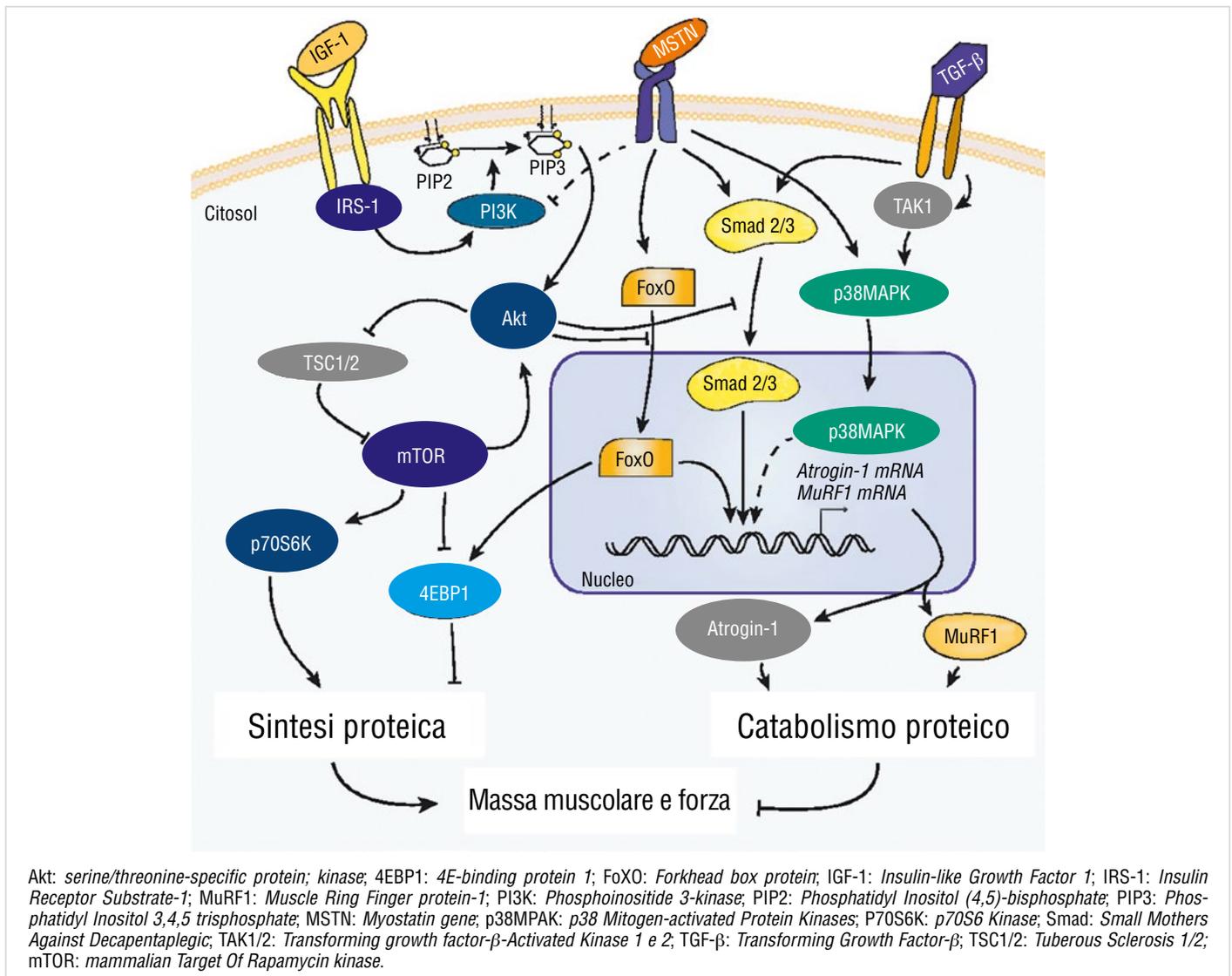


Figura 5.

Perturbazione dei *signalling* intracellulare in presenza di ridotta disponibilità di vitamina D, con effetti finali di riduzione delle sintesi proteiche, atrofia muscolare e disfunzione mitocondriale.

**Figura 6.**

Principali vie di segnale che regolando sintesi e catabolismo cellulare concorrono nel determinare la massa muscolare e conseguentemente la forza. L'omeostasi si realizza grazie a un'interazione reciproca di segnali catabolici e anabolici che rispondono a input esogeni alla cellula (ormoni, aminoacidi, fattori di crescita, citochine, ecc.) e interni a questa (status energetico).

regolazione dei livelli di stress ossidativo cellulare), con forte impatto sulla funzione del muscolo scheletrico.

Vitamina D e sistema immunitario

Un discorso di particolare interesse risiede nel rapporto tra vitamina D e sistema/risposta immunitaria. Il ruolo nell'immunomodulazione si dimostra a partire dalla presenza di recettori VDR in cellule dell'immunità, sia innata, sia adattativa, con un effetto modulatore della vitamina come conseguenza dell'interazione recettoriale. Infatti, VDR risulta espresso in cellule dendritiche, macrofagi, linfociti T e B e molte di queste legano calcitriolo in risposta ad agenti pro-infiammatori (ad es. TNF- α).

Gli effetti antimicrobici da più parte evidenziati vedono un coinvolgimento dell'attivazione di *Toll-like-receptors* (TLR) in cellule polimorfonucleate, monociti e macrofagi e in cellule epiteliali. La stimolazione di TLR porta alla produzione di peptidi, come catelicidina, e ROS con azione antimicrobica. Per quanto riguarda l'immunità adattativa, la vitamina D sembra inibire i linfociti Th1 (oltre che i Th17), associati all'autoimmunità, e indurre la proliferazione dei linfociti Th2, i quali inibiscono i Th1. La vitamina D sopprime, inoltre, la liberazione di numerose citochine infiammatorie, come IL-1, IL-6, IL-12, e TNF- α , da parte di cellule antigene-presentanti, come macrofagi e cellule dendritiche.

Livelli di assunzione

Diverse linee guida concordano nel definire un deficit franco di vitamina D una concentrazione plasmatica di 25(OH)D inferiore a 30 nmol/l (12 ng/ml), mentre valori da 30 nmol/l a 50 nmol/l indicano uno stato di insufficienza. Secondo l'*Institute Of Medicine* (IOM), 50 nmol/l risultano sufficienti per il 97,5% della popolazione, mentre livelli superiori non conferiscono ulteriore beneficio per la salute ossea. Diversa l'opinione dell'*Endocrine Society* (ES) che ritiene soddisfacenti livelli superiori a 75 nmol/l e insufficienti quelli tra 50 e 75 nmol/l. In Tabella I sono riportati i valori target indicati dalle diverse società/agenzie scientifiche, nonché quelli indicati come pericolosi o tossici, e le dosi giornaliere raccomandate per gli adulti.

Sicurezza e interazione con farmaci

Un'eccessiva assunzione di vitamina D si associa a ipercalcemia, debolezza, perdita di peso, aumentato rischio di deposizione di calcoli renali di calcio e fosfato, e possibile calcificazione vascolare^{41,42}. Quando l'eccesso riguarda vitamina D e calcio è descritto, inoltre, un aumento del rischio d'importanti eventi cardiovascolari, tra i quali infarto e ictus, specie in donne nel periodo post-menopausale. Questa associazione è probabilmente correlabile a un aumentato stato di calcificazione vascolare, che si realizza nonostante il noto beneficio in termini di miglioramento del quadro lipidemico, con incremento delle lipoproteine ad alta densità⁴³.

Un capitolo di grande importanza riguarda il poco conosciuto campo delle interazioni della vitamina D con i farmaci. Il processo di metabolizzazione della vitamina D vede coinvolto il citocromo P450 e in particolare l'isoforma epatica più importante ovvero l'enzima 25-idrossilasi CYP3A4. Questo enzima converte ergo- e colecalciferolo a 25(OH)D ed è coinvolto nella biotrasformazione di moltissimi farmaci che, per la maggior

parte, ne rappresentano il substrato, mentre altri ne risultano inibitori (come avviene per il noto succo di pompelmo) o induttori⁴⁴ (Tab. II). Pertanto, la co-somministrazione di vitamina D può essere associata ad alterazione del metabolismo di quei farmaci che richiedono la funzione di CYP3A4. Dal momento che CYP3A4 risulta attivo a livello enterocitario, il fenomeno dell'interazione risulta non trascurabile per assunzioni orali di vitamina D e farmaci, mentre il problema è di rilevanza inferiore in caso di somministrazione endovenosa.

Visti i rischi legati al sovradosaggio e la possibile interazione con farmaci, le supplementazioni di vitamina D vanno gestite correttamente, considerando attentamente le richieste individuali e i concomitanti cambiamenti dietetici che possono favorirne la funzione.

Ruolo della vitamina D nel trattamento delle patologie croniche

Vitamina D, invecchiamento e sarcopenia

Numerose evidenze indicano un inverso rapporto dose risposta tra i livelli circolanti di vitamina D e il rischio di fratture ossee che si correla con il progressivo deterioramento sarcopenico. È quindi nel sistema osteomuscolare nella sua complessità che va ricercata l'efficacia della vitamina D, sia nel contrastare osteopenia/osteoporosi/fratture, sia sarcopenia/atrofia. Parte degli effetti sull'osso trovano probabilmente le loro origini, oltre che nel controllo della disponibilità di calcio e fosforo, anche in uno stimolo allo sviluppo e al rimodellamento osseo, alla funzione paratiroidea e alla funzione muscolare scheletrica. La possibilità di un effetto vitaminico diretto sull'osso è dimostrato dal fatto che le correzioni della disponibilità di calcio non modificano il quadro di osteopenia e l'aumento dei livelli circolanti di PTH nel topo doppio *null* per VDR e CYP27B1⁴⁵. Le dosi giornaliere di vitamina D normalmente consigliate in soggetti oltre i 70 anni di età per

Tabella I.

Concentrazioni plasmatiche di 25(OH)vitamina D considerate sicure e auspicabili; valori ematici di tossicità, fabbisogni giornalieri consigliati per gli adulti (RDA/RI/AI) e soglie di tollerabilità.

	IOM	EFSA	D-A-CH	NORDEN	Endocrine Society	Vitamin D Council
Valori plasmatici di 25(OH)D auspicabili (nmol/l)	50	50	50	50	75	100-250
Valori plasmatici di 25(OH)D potenzialmente pericolosi (nmol/L)	125	-	-	-	250	250-375
Valori plasmatici di 25(OH)D tossici (nmol/l)	-	-	> 400	-	-	> 375
RDA/RI/AI per adulti (UI/giorno)	600-800 ^a	600	800	400-800 ^a	1.500-2.000 ^b	5.000 ^c
Apporto giornaliero massimo tollerabile (UI)	4.000	4.000	4.000	4.000	10.000	10.000

IOM: *Institute of Medicine*; EFSA: *European Food Safety Authority*; D-A-CH: Germania (D), Austria (A), Svizzera (CH); NORDEN: paesi nordici (Danimarca, Islanda, Finlandia, Norvegia, Svezia); RDA: apporto dietetico consigliato; RI: apporto dietetico raccomandato; AI: apporto dietetico adeguato; UI: unità internazionali; ^a raccomandazioni età-dipendente; ^b per pazienti obesi si raccomanda una dose giornaliera di 3.000-6.000 UI, mentre per i pazienti affetti da carenza di vitamina D si raccomandano 50.000 UI una volta a settimana per 8 settimane; ^c è raccomandata una dose maggiore per gli obesi, la quantità non è specificata ma la concentrazione plasmatica di 25(OH)D dovrebbe essere circa 125 nmol/L.

Tabella II.

Farmaci che attraverso l'interazione con il citocromo CYP3A4 interagiscono con la vitamina D.

Substrato	Inibitori	Induttori
Analgesici: <ul style="list-style-type: none"> Paracetamolo Celecoxib Codeina Fentanil Antimicrobici: <ul style="list-style-type: none"> Dapsone Sulfametossazolo Bloccanti dei canali calcio: <ul style="list-style-type: none"> Nifedipina Chemioterapici: <ul style="list-style-type: none"> Ciclofosfamide Docetaxel Etoposide Ifosfamide Paclitaxel Vinblastina Vinorelbina Disfunzione erettile: <ul style="list-style-type: none"> Sildenafil Motilità gastrointestinale: <ul style="list-style-type: none"> Cisapride Immunosoppressivi: <ul style="list-style-type: none"> Ciclosporina A Sirolimus Tacrolimus 	Antidiabetici: <ul style="list-style-type: none"> Rosiglitazone* Antidepressivi: <ul style="list-style-type: none"> Fluoxetina* Antifungini: <ul style="list-style-type: none"> Clotrimazolo Posaconazolo[^] Itraconazolo[^] Ketoconazolo[^] Antimicrobici: <ul style="list-style-type: none"> Claritromicina[^] Doxiciclina Eritromicina Isoniazide* Primachina Tetraciclina Antipertensivi: <ul style="list-style-type: none"> Amlodipina* Diidralazina Diltiazem* Nicardipina Verapamile* Chemioterapici: <ul style="list-style-type: none"> Irinotecan Tamoxifene* Disfunzione erettile: <ul style="list-style-type: none"> Tadalafil* Immunosoppressivi: <ul style="list-style-type: none"> Ciclosporina A* Inibitori di pompa protonica: <ul style="list-style-type: none"> Omeprazolo Statine: <ul style="list-style-type: none"> Atorvastatina Inibitori delle proteasi: <ul style="list-style-type: none"> Saquinavir[^] Boceprevir[^] Indinavir[^] Nelfinavir[^] Telaprevir[^] 	Anticonvulsanti: <ul style="list-style-type: none"> Carbamazepina[†] Fenobarbital Fenitoina[†] Primidone Antimicrobici: <ul style="list-style-type: none"> Eritromicina Quinine[†] Rifampicina[†] Diuretici: <ul style="list-style-type: none"> Spironolattone[†] Chemioterapici: <ul style="list-style-type: none"> Ciclofosfamide[†] Ifosfamide[†] Paclitaxel Glucocorticoidi: <ul style="list-style-type: none"> Desametasone Vitamine: <ul style="list-style-type: none"> 1,25(OH)₂D (calcitriolo)

* Indica farmaci che sono inibitori reversibili di CYP3A4; † indica farmaci induttori del proprio metabolismo; ^ indica farmaci con maggiore attività inibitoria su CYP3A4.

la prevenzione della sarcopenia e delle fratture ossee sono pari a 800 UI.

Vitamina D, obesità e diabete

L'azione pleiotropica della vitamina D trova espressione in un suo effetto diretto, sia a livello adipocitario, sia a livello delle

cellule insulari beta del pancreas, giustificando di fatto la necessità di un giusto controllo dei livelli plasmatici in presenza di diabete/prediabete o intolleranza glucidica. VDR è presente negli adipociti, dove l'attivazione promuove lipogenesi e inibizione della lipolisi e a livello insulare pancreatico dove promuove la liberazione di insulina con un effetto, pertanto, secretagogo. La mancanza cronica di vitamina D è stata associata a resistenza insulinica, mentre, di contro, la supplementazione sembra prevenire l'evoluzione di quest'ultima in un quadro di franco diabete^{46,47}. I dosaggi segnalati in letteratura su soggetti obesi e/o diabetici sono molto variabili a seconda dei trial; riteniamo che un dosaggio di partenza pari a 600-1000 UI/die possa essere adeguato in molti soggetti, eventualmente poi aggiustato in relazione ai livelli plasmatici riscontrati nel corso dei follow-up.

Vitamina D e malattie cardiovascolari

Un campo di studio degli effetti della vitamina D nelle malattie croniche riguarda le patologie cardiovascolari. Nell'uomo studi ormai datati hanno rilevato come la grave carenza di vitamina D si associ a cardiomiopatia⁴⁸, correlando la minore esposizione al sole e i cambiamenti stagionali a un maggior rischio cardiovascolare. Nello studio NHANES III⁴⁹, bassi livelli di 25(OH)D (concentrazioni sieriche < 17,8 ng/ml) hanno mostrato una mortalità per tutte le cause maggiore del 26% rispetto al quartile superiore dopo aggiustamento per altri fattori di rischio (RR 1,26; 95% IC, 1,08-1,46). Successivi studi di coorte prospettici hanno collegato basse concentrazioni sieriche di 25(OH)D a maggiori rischi di malattia coronarica, ictus e insufficienza cardiaca⁵⁰. Nonostante queste osservazioni siano state confermate da numerosi altri lavori pubblicati sull'argomento, esistono dati controversi circa gli effetti derivanti dalla supplementazione di vitamina D sul rischio cardiovascolare. Due importanti metanalisi^{51,52} suggeriscono, infatti, come la supplementazione della vitamina non si associ a un miglioramento di questo rischio. Tuttavia, in entrambi i lavori il numero di soggetti caratterizzati da livelli di vitamina D molto bassi (< 30 nmol/l) risultava esiguo, non consentendo di trarre conclusioni definitive sull'argomento. Infatti, considerando i dati attualmente disponibili su larghe coorti di popolazione⁵³, si evince come esista una relazione non lineare tra eventi cardiovascolari e concentrazioni di 25(OH)D circolante, facendo emergere come l'effetto di protezione nei confronti delle malattie cardiovascolari possa essere significativo soprattutto supplementando soggetti con valori plasmatici inferiori a 30 nmol/l. Considerando queste premesse e il rischio di eventi avversi cardiovascolari, una supplementazione di 600-800 UI/die può essere utilizzata per evitare di raggiungere livelli inferiori a 30 nmol/l⁵⁴.

Vitamina D e immunologia

Alcuni studi clinici suggeriscono l'efficacia della vitamina D nelle infezioni, nelle malattie infiammatorie intestinali, malattie autoimmuni, atopia, asma e dermatite atopica, dove emergono diverse evidenze, sebbene in gran parte da confermare, di un effetto preventivo legato al mantenimento di

fisiologici livelli sierici. Per quanto riguarda l'immunità innata, gli studi definiscono l'efficacia antimicrobica della vitamina nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* e di altri patogeni, in particolare virus, responsabili di infezioni delle prime vie respiratorie. Per quanto concerne, invece, l'immunità adattativa, importanti indicazioni cliniche emergono anche per il ruolo della vitamina nelle malattie autoimmuni. Tra queste, un ruolo d'efficacia è stato riscontrato in diverse patologie, tra cui psoriasi, lupus eritematoso, diabete tipo 1, artrite reumatoide e sclerosi multipla⁵⁵. Data la variabilità fisiopatologica delle condizioni mediche che afferiscono a quest'area, non è possibile fornire un preciso dosaggio da seguire e pertanto è consigliabile personalizzare una supplementazione in base ai livelli ematici riscontrati. In tutti i casi la maggiore efficacia sembra emergere con somministrazione giornaliera anziché a bolo settimanale o mensile.

Vitamina D e BPCO

Un deficit in vitamina D è frequentemente riscontrato in pazienti con BPCO anche se rimangono dubbi circa la sua origine. Questo comporta un aumento secondario di PTH con insulino-resistenza, aumentata attività del sistema renina-angiotensina e infiammazione sistemica. Importante il ruolo della vitamina D nel mantenere la funzione immunitaria del paziente con BPCO, come dimostra la riduzione di frequenza delle *pousseau* in seguito a supplementazione di pazienti con grave insufficienza ventilatoria. Incertezze ancora sussistono circa gli effetti delle supplementazioni sulla funzione toraco-polmonare valutata mediante spirometria. Infatti, sebbene alcuni studi sembrino dimostrare un miglioramento di FEV1 e FVC⁵⁶, altri non hanno confermato questi dati⁵⁷. Sta di fatto che una supplementazione con vitamina D è indicata quando BPCO e insufficienza renale coesistono, per la relativa perdita di funzione dell'enzima 1- α idrossilasi renale. I dosaggi impiegati in questi pazienti sono piuttosto elevati e si posizionano intorno alle 100.000 UI/mese, nei casi con quadro sintomatologico di BPCO da moderato a severo.

Beta-idrossi-beta-metilbutirrato (HMB)

Sintesi e metabolismo

Per parlare di HMB ci si deve collegare al metabolismo e alla funzione anabolica-anticatabolica della leucina. Da oltre 30 anni la leucina è considerata un anti-catabolico, tuttavia, le concentrazioni che presentano in maniera apprezzabile questa attività sono 10-20 volte superiori a quelle necessarie per stimolare la sintesi proteica, così l'effetto anti-catabolico potrebbe essere attribuito a un suo metabolita, ovvero l'HMB. La prima reazione biochimica che porta alla produzione di HMB è la transaminazione della leucina ad acido α -chetoisocaproico (KIC) a opera dell'enzima BCAT. Tale reazione avviene prevalentemente a livello muscolare, con una via alternativa a livello epatico. La maggior parte del KIC viene convertita in isovaleril-CoA nei mitocondri, mentre solo una quota del 5% viene metabolizzata a HMB nel citosol grazie all'enzima KIC

disossigenasi. Per ottenere quantità di HMB muscolare utili ai fini anabolici/anticatabolici sono richieste quantità di leucina particolarmente elevate. Studi che utilizzano traccianti radioattivi stimano che la produzione complessiva di KIC da leucina rappresenti il 15% del *turnover* di questo aminoacido e che la produzione di HMB da KIC sia meno dell'1%. Quindi la produzione di HMB dal *turnover* della leucina è meno dello 0,1%. Un uomo adulto di 70 kg produce dai 200 ai 400 mg di HMB al giorno, in funzione dell'apporto alimentare di leucina. La concentrazione plasmatica di HMB, che risulta essere il 3% di quella della leucina, tende a diminuire con l'invecchiamento e risulta correlata alla forza e massa muscolare, sia nel giovane, sia nell'anziano sano, sia in pazienti affetti da malattie croniche come BPCO⁵⁸.

Gli studi di farmacocinetica hanno svelato una diversa biodisponibilità plasmatica tra la leucina e il suo metabolita. Per questi studi si utilizzano il sale calcico di HMB (Ca-HMB) o i *free-acid* HMB (FA-HMB). L'assunzione orale di circa 1,5 g di Ca-HMB determina un picco di concentrazione ematica dopo circa due ore, con lento declino successivo associato a incremento dell'escrezione urinaria. L'assunzione di FA-HMB sembra, invece, rendere disponibile HMB in circa 30 minuti e la cinetica d'assorbimento è migliore di quella che si ottiene con la somministrazione di Ca-HMB. Ovviamente le curve di assorbimento ed eliminazione si modificano se l'HMB fa parte di un supplemento multingrediente. Diversa e più rapida, invece, la farmacocinetica della leucina. Infatti, l'assunzione orale di 3 g di leucina vede un picco di concentrazione molto rapido (circa 500 μ M entro un'ora) con ritorno ai valori di base entro quattro ore dall'assunzione per incorporazione nelle proteine (Fig. 7). Recenti studi hanno paragonato gli effetti anabolici e anticatabolici dell'HMB in rapporto alla leucina, mettendo in luce un paragonabile effetto netto d'incremento delle sintesi, con una concomitante riduzione del catabolismo. Nonostante ciò, considerando però la diversa farmacocinetica, l'effetto dell'HMB, prolungandosi maggiormente nel tempo rispetto a quello della leucina, potrebbe essere impiegato soprattutto per rinforzare l'effetto anticatabolico di questa, creando un'azione di tipo "retard".

Meccanismi d'azione

In generale il destino epatico dell'HMB è primariamente quello di sintetizzare nuovo colesterolo, mentre a livello muscolare l'HMB sembra assumere un ruolo centrale nella regolazione dei processi legati all'ipertrofia e alla degradazione proteica, in misura tanto maggiore quanto più marcati sono stati i fenomeni microtraumatici indotti dall'esercizio fisico. I meccanismi muscolari sui quali l'HMB agirebbe comprendono: 1) l'*upregulation* sull'espressione genica dell'IGF-1 muscolare e il controllo sull'attivazione e la proliferazione delle cellule satelliti; 2) lo stimolo della sintesi proteica attraverso una maggiore fosforilazione di mTOR; 3) la soppressione della proteolisi muscolare grazie all'inibizione del sistema ubiquitina-proteosoma (Fig. 8).

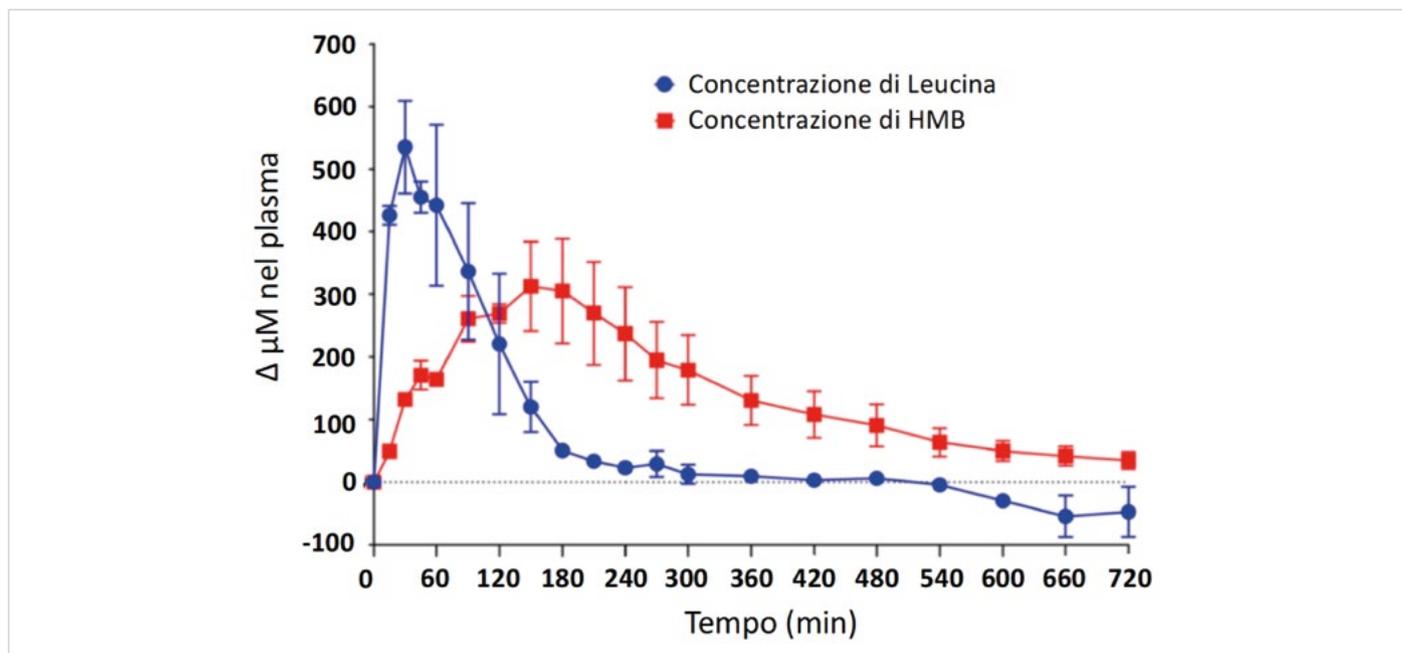


Figura 7.

Profilo plasmatico in seguito a supplementazione con 3 g di leucina e a 1,5 g di HMB. La farmacocinetica mostra come l'assorbimento della leucina e il ritorno delle concentrazioni ematiche ai livelli basali sia più veloce rispetto all'HMB.

Dosaggi e sicurezza

Ai fini dell'ipertrofia muscolare, secondo l'*International Society of Sports Nutrition*, il dosaggio giornaliero di HMB ideale è di 3 g o 38 mg/kg suddiviso in tre somministrazioni da assumere 60-120 minuti prima dell'esercizio, se in forma di Ca-HMB, o 30-60 minuti prima dell'esercizio, se in forma di FA-HMB. In soggetti non allenati si raccomanda un'assunzione per almeno 3 settimane, mentre in soggetti allenati si raccomanda un'assunzione per almeno 6 settimane. Gli studi tossicologici escludono qualsiasi effetto negativo con supplementazione di HMB. Il valore di *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) raggiunge i 4,16 g/kg, il che significa, sulla base della dose equivalente umana normalizzata per l'area corporea (*Human Equivalent Dosing*), che un uomo di 80 kg potrebbe consumare 50 g/die di HMB per 3 mesi senza che possano essere registrati fenomeni avversi. In molti studi dosaggi superiori a 6 g/die non sono stati associati ad alterazioni clinicamente rilevanti.

Ruolo dell'HMB nel trattamento delle patologie croniche

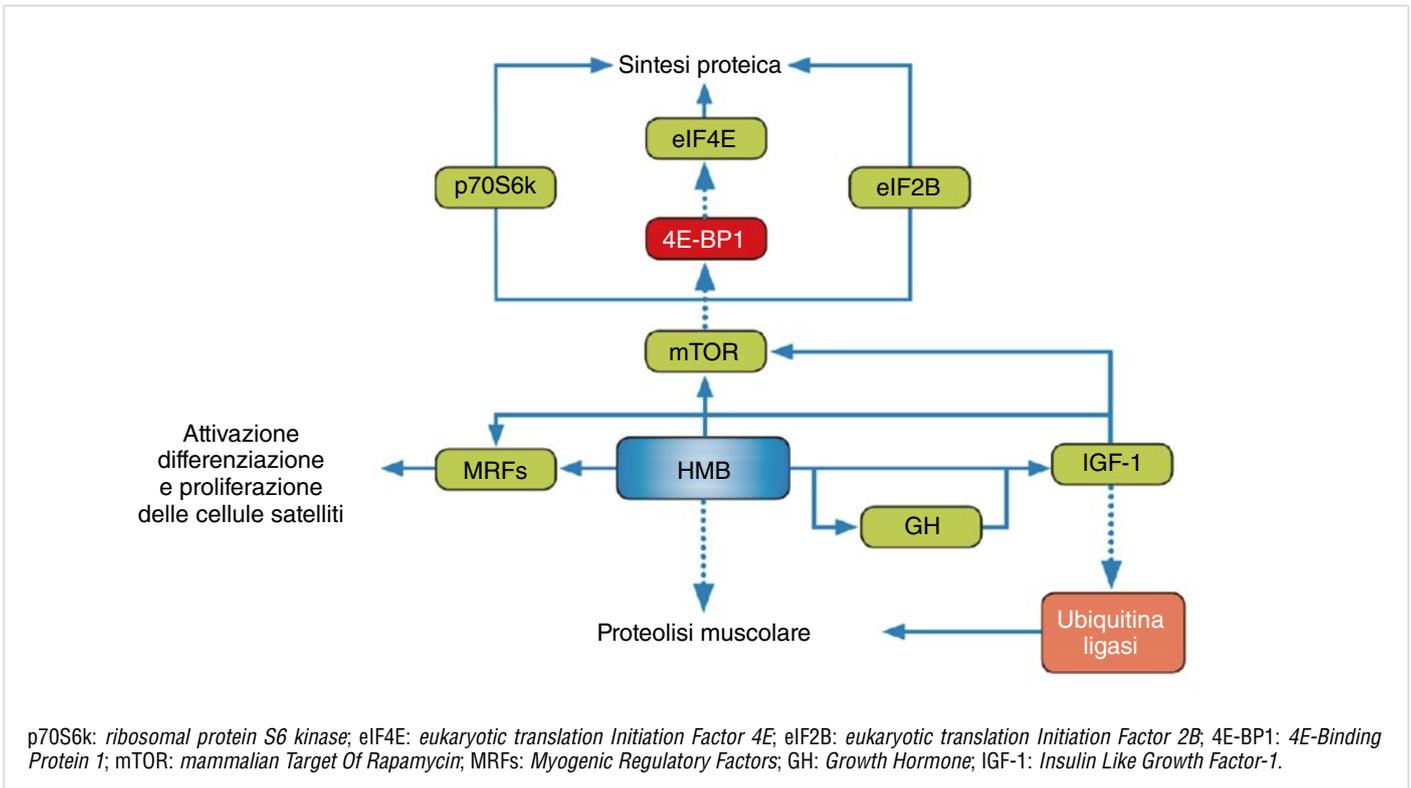
Osservazioni confermano la possibilità di un effetto di potenziamento dato dalla co-somministrazione di HMB e leucina nelle condizioni in cui sia necessario il ripristino del trofismo muscolare. L'utilizzo di HMB da solo o come parte di un multingrediente è stato associato a miglioramenti della composizione corporea, della massa e forza muscolare in diver-

se condizioni croniche, nel paziente anziano ospedalizzato malnutrito, nelle fasi postoperatorie di chirurgia ortopedica o in presenza di patologie respiratorie croniche (bronchiectasie, BPCO) ⁵⁹⁻⁶².

In linea generale gli effetti anabolici netti riscontrati nel soggetto anziano risultano maggiormente evidenti per somministrazioni da 3 a 12 mesi in caso di decondizionamento all'esercizio, mentre un effetto minore o nullo si riscontra per quelli dediti ad attività fisica regolare che impegna esercizi di forza. Come per la leucina anche per l'HMB si riconoscono campi di applicazione assai più estesi di quelli legati al mantenimento e allo sviluppo della massa muscolare scheletrica. Alcune recenti osservazioni ⁶³ indicano, ad esempio, un ruolo dell'HMB nel promuovere il consumo degli acidi grassi nel muscolo e negli adipociti, con aumento della lipolisi e riduzione del grasso corporeo specie quando l'assunzione si associa a esercizio svolto con regolarità.

Co-somministrazione di EAA, vitamina D e HMB: una questione aperta

Sebbene i dati a disposizione definiscano abbastanza chiaramente l'effetto quali-quantitativo della supplementazione nutrizionale, mediante vitamina D e EAA considerati singolarmente, iniziali tentativi indicano come una supplementazione multingrediente che utilizzi entrambi i composti possa rappresentare un valido ausilio per il controllo di alcune condizioni croniche di rilievo clinico. I meccanismi

**Figura 8.**

Schema che illustra i principali meccanismi molecolari anabolici/anticatabolici che coinvolgono l'HMB a livello muscolare.

molecolari che sottendono la funzione degli EAA, così come di alcuni loro metaboliti (HMB), e della vitamina D disvelano, come ampiamente descritto, una complessa funzione pleiotropica che trova nel muscolo un target di primaria importanza. Insieme, infatti, modulano la risposta anabolica e catabolica cellulare, manifestando azioni essenziali per la sopravvivenza dell'individuo. Fermo restando i pochissimi studi attualmente disponibili che considerano gli effetti di una supplementazione multingrediente rispetto al monocomponente, tuttavia, è presumibile, almeno a livello muscolare, che una parziale sovrapposizione dei meccanismi molecolari nei quali EAA, vitamina D e HMB risultano coinvolti possa determinare un effetto di potenziamento sinergico della loro efficacia. Nonostante siano ancora numerosi gli aspetti inesplorati, assai incoraggianti sono dunque gli elementi teorici e le evidenze meccanicistiche che vedono nella corretta disponibilità di EAA, vitamina D (e probabilmente HMB) un fattore cruciale per il mantenimento del benessere generale dell'uomo e per l'accelerazione dei processi riabilitativi di guarigione in presenza di patologie croniche e/o età correlate.

Bibliografia

- Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2006;84:475-82. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>
- Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, et al. Skeletal muscle regulates me-

- tabolism via interorgan crosstalk: roles in health and disease. *J Am Med Dir Assoc* 2016;17:789-96. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.04.019>
- D'Antona G. mTOR, nutrition and aging. In: Malavolta M, Mocchegiani E, eds. *Molecular basis of nutrition and aging*. Elsevier 2016;11:141-53. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00388-7>
- D'Antona G. Amino acids supplementation as nutritional therapy strategy in diabetes mellitus. *Glucose intake util. Pre-diabetes diabetes*. Elsevier 2015, pp. 387-401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800093-9.00032-6>
- D'Antona G, Ragni M, Cardile A, et al. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab* 2010;12:362-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.016>
- Wolfe RR. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality? *J Int Soc Sports Nutr* 2017;14:30. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0184-9>
- Green CL, Lamming DW. Regulation of metabolic health by essential dietary amino acids. *Mech Ageing Dev* 2019;177:186-200. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.07.004>
- Nichols S, McGregor G, Al-Mohammad A, et al. The effect of protein and essential amino acid supplementation on muscle strength and performance in patients with chronic heart failure: a systematic review. *Eur J Nutr* 2020;59:1785-801. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02108-z>
- Cano NJM, Fouque D, Lerverve XM. Application of branched-chain amino acids in human pathological states: renal failure. *J Nutr* 2006;136:299S-307S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.299S>
- Cholewa JM, Dardevet D, Lima-Soares F, et al. Dietary proteins and amino acids in the control of the muscle mass during immobilization and aging: role of the MPS response. *Amino Acids* 2017;49:811-20. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2390-9>
- Negro M, Perna S, Spadaccini D, et al. Effects of 12 weeks of Essential Amino Acids (EAA)-based multi-ingredient nutritional supplementation on muscle mass, muscle strength, muscle power and fatigue in healthy elderly subjects: a randomized controlled double-blind study. *J Nutr Health Aging* 2019;23:414-24. <https://doi.org/10.1007/s12603-019-1163-4>

- ¹² Dawson-Hughes B. Acid-base balance of the diet—implications for bone and muscle. *Eur J Clin Nutr* 2020;74:7-13. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0691-7>
- ¹³ Potier M, Darcel N, Tomé D. Protein, amino acids and the control of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:54-8. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e-32831b9e01>
- ¹⁴ Batsis JA, Villareal DT. Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:513-37. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0062-9>
- ¹⁵ Newsholme P. Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. *Front Biosci* 2011;16:315. <https://doi.org/10.2741/3690>
- ¹⁶ Solerte SB, Fioravanti M, Locatelli E, et al. Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2008;101:S82-8. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.03.006>
- ¹⁷ Kang S, Chemaly ER, Hajjar RJ, et al. Resistin Promotes Cardiac Hypertrophy via the AMP-activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal Kinase/Insulin Receptor Substrate 1 (JNK/IRS1) Pathways. *J Biol Chem* 2011;286:18465-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.200022>
- ¹⁸ Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, et al. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med* 2008;22:105-12. <https://doi.org/10.3892/ijmm.22.1.105>
- ¹⁹ Bianchi VE. Impact of nutrition on cardiovascular function. *Curr Probl Cardiol* 2020;45:100391. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2018.08.003>
- ²⁰ Aquilani R, Opasich C, Gualco A, et al. Adequate energy-protein intake is not enough to improve nutritional and metabolic status in muscle-depleted patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008;10:1127-35. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.09.002>
- ²¹ Nie C, He T, Zhang W, et al. Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism. *Int J Mol Sci* 2018;19:954. <https://doi.org/10.3390/ijms19040954>
- ²² Aquilani R, Zuccarelli GC, Dioguardi FS, et al. Effects of oral amino acid supplementation on long-term-care-acquired infections in elderly patients. *Arch Gerontol Geriatr* 2011;52:e123-8. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2010.09.005>
- ²³ Bifari F, Ruocco C, Decimo I, et al. Amino acid supplements and metabolic health: a potential interplay between intestinal microbiota and systems control. *Genes Nutr* 2017;12:27. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0582-2>
- ²⁴ Ticinesi A, Lauretani F, Tana C, et al. Exercise and immune system as modulators of intestinal microbiome: implications for the gut-muscle axis hypothesis. *Exerc Immunol Rev* 2019;25:84-95.
- ²⁵ Ceelen JJM, Langen RCJ, Schols AMWJ. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 2014;8:339-45. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000088>
- ²⁶ Agustí A, Morlá M, Sauleda J, et al. NF- κ B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 2004;59:483-7. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.017640>
- ²⁷ Puente-Maestu L, Lázaro A, Humanes B. Metabolic derangements in COPD muscle dysfunction. *J Appl Physiol* 2013;114:1282-90. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00815.2012>
- ²⁸ D'Antona G. The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2003;552:499-511. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046276>
- ²⁹ Aquilani R, D'Antona G, Baiardi P, et al. Essential amino acids and exercise tolerance in elderly muscle-depleted subjects with chronic diseases: a rehabilitation without rehabilitation? *Biomed Res Int* 2014;2014:1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/341603>
- ³⁰ 1972;237:63-4. <https://doi.org/10.1038/newbio237063a0>
- ³¹ Shieh A, Chun RF, Ma C, et al. Effects of high-dose vitamin D₂ versus D₃ on total and free 25-hydroxyvitamin D and markers of calcium balance. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3070-8. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1871>
- ³² Allison RJ, Farooq A, Cherif A, et al. Why don't serum Vitamin D concentrations associate with BMD by DXA? A case of being a "bound" to the wrong assay? Implications for Vitamin D screening. *Br J Sports Med* 2018;52:522-6. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-097130>
- ³³ Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, et al. Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for geno. *Mol Endocrinol* 1997;11(10):1518-31. <https://doi.org/10.1210/me.11.10.1518>
- ³⁴ Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, et al. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004;18:2660-71. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0116>
- ³⁵ Ceglia L, Niramitmahapanya S, Da Silva Morais M, et al. A Randomized study on the effect of vitamin D₃ supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin d receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1927-35. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2820>
- ³⁶ Lips P, Binkley N, Pfeifer M, et al. Once-weekly dose of 8400 IU vitamin D₃ compared with placebo: Effects on neuromuscular function and tolerability in older adults with vitamin D insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2010;91:985-91. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28113>
- ³⁷ Dzik K, Skrobot W, Flis DJ, et al. Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. *Eur J Appl Physiol* 2018;118:143-51. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3755-1>
- ³⁸ Igde M, Baran P, Oksuz BG, et al. Association between the oxidative status, Vitamin D levels and respiratory function in asthmatic children. *Niger J Clin Pract* 2018;21:63-8. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_373_16
- ³⁹ Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:14440-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- ⁴⁰ Birge SJ, Haddad JG. 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J Clin Invest* 1975;56:1100-7. <https://doi.org/10.1172/JCI108184>
- ⁴¹ Bruyère O, Cavalier E, Souberbielle J-C, et al. Effects of vitamin D in the elderly population: current status and perspectives. *Arch Public Heal* 2014;72:32. <https://doi.org/10.1186/2049-3258-72-32>
- ⁴² Hathcock JN, Shao A, Vieth R, et al. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007;85:6-18. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.6>
- ⁴³ Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, et al. Calcium plus Vitamin D Supplementation and the Risk of Fractures. *N Engl J Med* 2006;354:669-83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055218>
- ⁴⁴ Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. *BMJ* 2008;336:262-6. <https://doi.org/10.1136/bmj.39440.525752.BE>
- ⁴⁵ Zhou S-F. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* 2008;9:310-22. <https://doi.org/10.2174/138920008784220664>
- ⁴⁶ Panda DK, Miao D, Bolivar I, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:16754-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310271200>
- ⁴⁷ Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, et al. Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic β cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011;94:486-94. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.011684>
- ⁴⁸ Pittas AG, Lau J, Hu FB, et al. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-29. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0298>
- ⁴⁹ Uysal S, Kalayci AG, Baysal K. Cardiac functions in children with vitamin d deficiency rickets. *Pediatr Cardiol* 1999;20:283-6. <https://doi.org/10.1007/s002469900464>
- ⁵⁰ Melamed ML, Michos ED, Post W, et al. 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. *Arch Intern Med* 2008;168:1629-37. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1629>
- ⁵¹ Michos ED, Misialek JR, Selvin E, et al. 25-hydroxyvitamin D levels, vitamin D binding protein gene polymorphisms and incident coronary heart disease among whites and blacks: The ARIC study. *Atherosclerosis* 2015;241:12-7. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.803>
- ⁵² Manson JE, Cook NR, Lee I-M, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2019;380:33-44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809944>
- ⁵³ Scragg R, Stewart AW, Waayer D, et al. Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on cardiovascular disease in the vitamin D Assessment Study. *JAMA Cardiol* 2017;2:608. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.0175>
- ⁵⁴ Zhang R, Li B, Gao X, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the risk of cardiovascular disease: dose-response meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr* 2017;105:810-9. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140392>

- ⁵⁵ Zittermann A, Pilz S. Vitamin D and cardiovascular disease: an update. *Anticancer Res* 2019;39:4627-35. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13643>
- ⁵⁶ Mokry LE, Ross S, Ahmad OS, et al. Vitamin D and risk of multiple sclerosis: a mendelian randomization study. *PLOS Med* 2015;12:e1001866. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001866>.
- ⁵⁷ Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-Hydroxyvitamin D and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest* 2005;128:3792-8. <https://doi.org/10.1378/chest.128.6.3792>
- ⁵⁸ Shaheen SO, Jameson KA, Robinson SM, et al. Relationship of vitamin D status to adult lung function and COPD. *Thorax* 2011;66:692-8. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.155234>
- ⁵⁹ Engelen MP, Walker DK, Wierzbowska-Mcnew A, et al. MON-P130: B-Hydroxy-B-Methylbutyrate (HMB) plasma levels are strongly related to muscle mass and strength in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Nutr* 2017;36:S227. [https://doi.org/10.1016/S0261-5614\(17\)30955-X](https://doi.org/10.1016/S0261-5614(17)30955-X)
- ⁶⁰ Ekinci O, Yanik S, Terzioğlu Bebitoğlu B, et al. Effect of Calcium β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (CaHMB), vitamin D, and protein supplementation on postoperative immobilization in malnourished older adult patients with hip fracture. *Nutr Clin Pract* 2016;31:829-35. <https://doi.org/10.1177/0884533616629628>.
- ⁶¹ Nishizaki K, Ikegami H, Tanaka Y, et al. Effects of supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methyl butyrate, L-arginine, and L-glutamine on postoperative recovery of quadriceps muscle strength after total knee arthroplasty. *Asia Pac J Clin Nutr* 2015;24:412-20. <https://doi.org/10.6133/apjcn.2015.24.3.01>
- ⁶² Oliveira G, Oliveira C, Doña E, et al. Oral supplement enriched in HMB combined with pulmonary rehabilitation improves body composition and health related quality of life in patients with bronchiectasis (Prospective, Randomised Study). *Clin Nutr* 2016;35:1015-22. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.10.001>
- ⁶³ Sanz-Paris A, Camprubi-Robles M, Lopez-Pedrosa JM, et al. Role of oral nutritional supplements enriched with B-hydroxy-B-Methylbutyrate in maintaining muscle function and improving clinical outcomes in various clinical settings. *J Nutr Health Aging* 2018;22:664-75. <https://doi.org/10.1007/s12603-018-0995-7>
- ⁶⁴ He X, Duan Y, Yao K, et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate, mitochondrial biogenesis, and skeletal muscle health. *Amino Acids* 2016;48:653-64. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2126-7>

Comitato Scientifico

Ferdinando De Negri
Medicina Interna
Pier Carlo Salari
Pediatria
Massimo Mari
Psichiatria

Direttore Responsabile

Patrizia Alma Pacini

Edizione

Pacini Editore Srl - Via A. Gherardesca 1 - 56121 Pisa
Tel. 050 313011 - Fax 050 3130300
info@pacinieditore.it - www.pacinieditore.it

Divisione Pacini Editore Medicina

Andrea Tognelli - Medical Projects and Publishing Director
Tel. 050 3130255 - atognelli@pacinieditore.it
Fabio Poponcini - Sales Manager
Tel. 050 3130218 - fpoponcini@pacinieditore.it
Alessandra Crosato - Junior Sales Manager
Tel. 050 31 30 239 - acrosato@pacinieditore.it

Manuela Mori - Advertising and New Media Manager
Tel. 050 3130217 - mmori@pacinieditore.it
Lucia Castelli - Redazione
Tel. 050 3130224 - lcastelli@pacinieditore.it
Massimo Arcidiacono - Grafica e impaginazione
Tel. 050 3130231 - marcidiacono@pacinieditore.it

© Copyright by Pacini Editore Srl - Pisa



Open Access

La rivista è open access e divulgata sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). Il fascicolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>.

Registrazione al Tribunale di Pisa n. 23 del 12/12/1998.

Quaderni di Medicina e Chirurgia 2020, Supplemento n. 2 al n. 2-2020. L'editore resta a disposizione degli aventi diritto con i quali non è stato possibile comunicare e per le eventuali omissioni. Le fotocopie per uso personale del lettore (per propri scopi di lettura, studio, consultazione) possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume/fascicolo di periodico, escluse le pagine pubblicitarie, dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dalla Legge n. 633 del 1941 e a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEARedi: <https://www.clearedi.org/topmenu/HOME.aspx>.

Finito di stampare nel mese di Dicembre 2020 presso le IGP della Pacini Editore, Pisa.